

**Auxiliar-vermittelte
Synthese von nicht-natürlichen Aminosäuren als
Bausteine für RNA-Liganden**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Chemische und Pharmazeutische
Wissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Verena Ludwig
aus Bückeburg

Frankfurt am Main
2005
(DF1)

Vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der Johann
Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. H. Schwalbe

Erster Gutachter: Prof. Dr. M. W. Göbel

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. H. Schwalbe

Datum der Disputation: 15.06.2005

Kurzfassung
Auxiliar-vermittelte Synthese von nicht-natürlichen Aminosäuren
als Bausteine für RNA-Liganden

Verena Ludwig

In den letzten Jahren wurde deutlich, daß *mRNAs* regulatorische Elemente aufweisen. Ein Beispiel hierfür ist z. B. die Transkription des Human Immunodeficiency Virus Typ1 (HIV-1). Die Arginin-reiche Domäne des Tat-Proteins interagiert hierbei mit einer Bindungsstelle innerhalb der Bulge-Region der TAR-RNA. Das Vorliegen des hochkonservierten Tat-TAR-Komplexes ist die Voraussetzung für die effiziente Transkription viraler Gene. Eine kompetitive Bindung synthetischer Liganden an die Bulge-Region sollte daher den viralen Vermehrungszyklus unterbrechen. Hochspezifische Liganden mit inhibitorischem Potential sind somit von größtem Interesse. Für eine hohe Liganden-Affinität sind neben ionischen Wechselwirkungen und H-Brücken-Interaktionen vor allem auch Stapelwechselwirkungen (stacking) von entscheidender Bedeutung. Die Ligandensuche wurde auf Tripeptide fokussiert. Da die Anzahl natürlich vorkommender aromatischer Aminosäuren sehr limitiert ist, erfolgte im Rahmen dieser Arbeit zunächst eine stereoselektive Synthese von neuen, nicht-natürlichen Aminosäuren mit heteroaromatischen Seitenketten. Um den generellen Einsatz dieser Bausteine in kombinatorischen Bibliotheken zu demonstrieren, wurden zunächst Tripeptide des Musters Arg-X-Arg hergestellt. Bereits diese Tripeptide zeigten in einem Fluoreszenz-Assay inhibierende Effekte auf den Tat-TAR-Komplex von HIV-1 mit IC₅₀-Werten von 2 - 80 µM. Diese vielversprechenden Liganden wiesen auch in einem Tat-TAR kontrollierten Reporter-gen-Assay stark inhibierende Wirkung in den Zellkulturen auf. Am Beispiel eines Peptides ließ sich mittels NMR-Spektroskopie eine Komplexkonformation bestimmen, die der des bekannten TAR-Argininamid-Komplexes entspricht. Durch den Einsatz von nicht-natürlichen und Standard-Aminosäuren in kombinatorischen Tripeptidbibliotheken (*split and combine*-Methode) konnte die Suche von potentiellen Peptid-Liganden um ein Vielfaches erweitert werden. Über ein on-bead-Screening ließen sich weitere vielversprechende TAR-bindende Tripeptide identifizieren. Die RNA-Ligandensuche wurde desweiteren auf die ϕ -RNA (HIV-1) und auf die *mRNA* des onkogenen bcr-abl Proteins ausgeweitet. Auch hier konnten einige RNA-bindende Tripeptide isoliert werden.

Abstract

Auxiliary-mediated synthesis of non-natural amino acids as building blocks for RNA-ligands

Verena Ludwig

In the last couple of years it became clear that many mRNAs contain regulatory elements. Complex formation of the TAR-RNA and the tat protein for instance is crucial for the efficient transcription of HIV genes. The goal of this thesis was the synthesis of peptidic tat antagonists. Apart from electrostatic interactions, stacking was found to be fundamental for the molecular recognition of RNA. Because of the limited number of aromatic amino acids given by nature, this work was focused on the synthetic access to a broad scope of aromatic and heteroaromatic analogues. Five non-natural amino acids could be synthesized by a stereoselective total synthesis. To demonstrate the applicability of the new amino acids for solid phase synthesis, tripeptides following the pattern Arg-X-Arg were prepared.

These tripeptides were also tested for their binding affinity to HIV-1 TAR-RNA by a *fluorescence* assay and compared with naturally occurring ligands. The new peptides showed IC_{50} values between 2 and 80 μ M. Additionally, when tested in tat-TAR controlled reporter gene assay, strong inhibiting effects could be verified. By NMR-spectroscopy a complex formation similar to the well-known TAR-argininamide-complex was determined for one of the tripeptides.

Using non-natural and standard amino acids as building blocks in combinatorial tripeptide libraries allowed to screen a large number of possible RNA-binders in parallel. On-bead-screening lead to promising TAR-binding tripeptides in a straightforward manner. Apart from focussing on TAR-ligands, the search was also extended to other targets such as ϕ -RNA (HIV-1) and the mRNA of the oncogene bcr-abl protein. Again, many RNA-binding tripeptides were identified, demonstrating the versatility of this screening method.

Meinen Eltern

Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von April 2001 bis Januar 2005 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. M. W. Göbel am Institut für Organische Chemie der Johann Wolfgang Goethe Universität in Frankfurt am Main angefertigt.

An dieser Stelle möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. M. W. Göbel für die Überlassung dieses vielseitigen Themas, die Betreuung und die anregenden Diskussionen während dieser Arbeit danken.

Der DFG danke ich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Sonderforschungsbereiches RNA-Ligand-Wechselwirkungen (SFB 579) und der Möglichkeit der Teilnahme an ausländischen Tagungen.

Herrn Dr. J. G. Zimmermann und seinem Team möchte ich für die Aufnahme von NMR-Spektren, Frau M. Christof für die Anfertigung der Elementaranalysen, Frau I. Prieß und Frau H. Brill für die Messung von Massenspektren danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. G. Dürner und seinen Mitarbeiterinnen Frau G. Stracke, Frau E. Müller und Frau M. Funke für die Trennungen mittels HPLC und der Bereitstellung destillierter Lösungsmittel.

Frau Dr. U. Dietrich und ihrer Arbeitsgruppe danke ich für die Durchführung der Zellkultur-Experimente und die ausgezeichnete Zusammenarbeit.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. H. Schwalbe, Herrn Dr. J. Wöhnert und Mitarbeitern für die NMR-spektroskopischen Untersuchungen an Peptid-RNA Komplexen. Für die Durchführung dieser Experimente möchte ich in diesem Zusammenhang ganz besonders Herrn Dipl.-Chem. J. Ferner danken. Herrn Dr. J. Hennig (Scripps Research Institute) danke ich für die Bereitstellung der HIV-2 TAR-RNA Probe.

Desweiteren danke ich Herrn Prof. Dr. G. Schneider und seinen Mitarbeitern Herrn Dipl.-Biol. S. Renner und Herrn Dipl.-Ing. Dipl.-Inf. A. Givechi für die hervorragende Zusammenarbeit.

Mein Dank gilt außerdem den Mitarbeitern des Arbeitskreises von Herrn Dr. K. Langer, die uns die Durchführung der Fluoreszenz-Messungen ermöglichten, sowie für die freundliche Atmosphäre.

Frau Ruppenthal danke ich für die jederzeit vorhandene Hilfsbereitschaft seitens des Sekretariats und für ihre stets erfrischende Art.

Frau Dr. U. Scheffer und ihren Mitarbeiterinnen Frau E. Kalden und Frau N. Brüssler bin ich für die Bereitstellung von RNA-Proben und Puffern, sowie für die Unterstützung bei der Durchführung biochemischer Fragestellungen sehr dankbar.

Für das kritische Lesen und die hilfreichen Anregungen der vorliegenden Arbeit danke ich Herrn Dr. E. Claus, Herrn Dipl.-Chem. O. Boden, Frau Dr. U. Scheffer, Herrn Dipl.-Chem. S. Ullrich und Herrn Dipl.-Chem. M. Suhartono.

Für die intensive Zusammenarbeit und Bereitstellung weiterer nicht-natürlicher Aminosäuren für die kombinatorische Synthese bedanke ich mich besonders bei Herrn Dr. A. Krebs und Herrn Dipl.-Chem. M. Suhartono. Die ähnliche Themenstellung ermöglichte hierbei einen regen Informationsaustausch.

Für die angenehme Laboratmosphäre und gute Zusammenarbeit möchte ich allen Mitgliedern des Arbeitskreises herzlich danken. Besonders danke ich hierbei Herrn D. Akalay, Frau K. Beier, Herrn Dr. M. Hey, Herrn Dr. Z. Nazir, Herrn Dipl.-Chem. S. Peter, Herrn Dipl.-Chem. G. Seifert, Frau Dipl.-Chem. N. Tatarovic, Herrn Dipl.-Chem. C. Timm, Herrn Dipl.-Chem. S. Ullrich, Dipl.-Chem. H. Walther und Herrn Dipl.-Chem. M. Weimar für unzählige anregende Diskussionen nicht ausschließlich fachlicher Natur.

Für die über den Universitätsalltag hinausgehende Freundschaft bin ich Herrn Dipl.-Chem. O. Boden und Frau Dr. A. Scharrer sehr dankbar. Ihre Mithilfe bei Fehler-suche und Lösung der zahlreich anfallenden GC- und Computerprobleme haben wesentlich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinem Freund Eckhard Claus für ihre Unterstützung, Liebe und den Rückhalt, vor allem in schwierigen Zeiten.

1	<i>Einleitung</i>	1
2	<i>Eigenschaften des HI-Virus und Ansatzpunkte zur Bekämpfung</i>	4
2.1	Die Replikation des HI-Virus	4
2.1.1	Frühe Phase	5
2.1.2	Späte Phase	7
2.2	Derzeitige Medikamente zur Behandlung von HIV	8
2.2.1	Nucleosid Analoga	9
2.2.2	Nicht-nucleosidische Reverse Transkriptase Inhibitoren	10
2.2.3	Protease Inhibitoren	10
2.2.4	Inhibierung des HIV-Eintritts	10
2.3	Zukunftsperspektiven	10
3	<i>TAR-Liganden</i>	12
3.1	Aminoglykoside	13
3.2	Small Molecules	14
3.3	Peptidische Strukturen	16
4	<i>Die mRNA des Bcr-Abl Proteins als neue RNA-Zielstruktur</i>	20
4.1	Das Bcr-Abl Protein als Auslöser der chronisch myeloischen Leukämie	20
4.2	Molekularer Hintergrund der Philadelphia Chromosom Translokation	20
4.3	Wirkstoffe zur Therapie der CML	22
4.3.1	Analogie der Resistenzen von CML und HIV	24
5	<i>Synthese nicht-natürlicher Aminosäuren</i>	25
5.1	Methoden zur enantioselektiven Synthese von Aminosäuren	25
5.1.1	Synthese von α -Aminosäuren nach Schöllkopf	25
5.1.2	Synthese von α -Aminosäuren nach Evans	26
5.1.3	Synthese von α -Aminosäuren nach Oppolzer	27

5.1.4	Synthese von α -Aminosäuren durch Phasen-Transfer-Katalysatoren	29
5.1.5	Synthese von α -Aminosäuren nach der Strecker-Methode	29
5.1.6	Chiral-Pool Synthese von α -Aminosäuren	30
6	Eigene Arbeiten	33
6.1	Stereoselektive Synthese von nicht-natürlichen Aminosäuren	33
6.2	Einsatz der nicht-natürlichen Aminosäuren in der Festphasen Tripeptid-Synthese	42
7	In vitro Assay und Zellkulturexperimente	47
7.1	Erweiterung des Assays durch Konkurrenzexperimente	51
7.1.1	Titration des Tat-Peptids mit $tRNA^{Phe}$	51
7.2	Untersuchungen mit der HIV-2 TAR-RNA	56
7.3	In vivo Untersuchungen in Zellkulturassays	57
8	NMR-Struktur Aufklärung	62
9	Bibliotheken	66
9.1	Zuordnung der Sequenzen	67
9.1.1	Hochfrequenz Tags	67
9.1.2	Photolytisch spaltbare Reportermoleküle	68
9.1.3	Screening mit einem "on bead" Bindungs-Assay	68
9.2	Eigene Arbeiten	69
9.3	Inkubation der 4096er Bibliothek (I) mit TAR $_{wt}$ -RNA $_{fl}$	75
9.4	Herstellung einer zweiten 4096er Bibliothek (II) mit verbessertem Tagschema	77
9.5	Inkubation der 4096er Bibliothek (II) mit TAR $_{wtfl}$	79
9.6	Inkubation der 4096er Bibliothek (II) mit T10-Fluorescein	81
9.7	Inkubation der 4096er Bibliothek (II) mit TAR $_{bulgeless}$	81
9.8	Inkubationen mit der TAR $_{loopless}$ Mutante	83
9.9	Ausweitung der Ligandensuche auf weitere Zielstrukturen	84
9.10	Inkubation der 4096er Bibliothek (II) mit Bcr-Abl-mRNA	85

9.11	Inkubation der 4096er Bibliothek (I) mit ψ -RNA	87
9.12	Optimierung der Inkubationsbedingungen durch eine neue Bibliothek.....	89
9.13	Herstellung einer 343er Bibliothek aus Standard-Aminosäuren	90
9.14	Inkubationen der 343er Bibliothek mit fluoreszenz-markierter RNA....	90
9.15	Inkubation der acetylierten 343er Bibliothek mit TARwt.....	91
9.16	Inkubation der acetylierten 343er Bibliothek mit TARbl.....	92
9.17	Inkubation der 343er Bibliothek mit dem T10 Linker.....	94
9.18	Inkubation der acetylierten 343er Bibliothek mit TARll.....	94
9.19	Weitere Methoden zur Auffindung von Bulge- und Loop-Bindern	95
9.20	Inkubation der acetylierten 343er Bibliothek mit TARwt in Gegenwart von L-His-L-His-L-His	96
9.21	Inkubation der acetylierten 343er Bibliothek mit TARwt im Medium Methanol : TK-Puffer 40:60.....	97
9.22	Inkubation der acetylierten 343er Bibliothek mit TARwt in Gegenwart erhöhter Salzkonzentration.....	99
9.23	Inkubation der acetylierten 343er Bibliothek mit TARwt in Gegenwart von D-Arg-D-Arg-D-Arg	100
9.24	Ergebnisse aus den Bibliotheken im Überblick.....	102
9.25	Bestimmung der IC ₅₀ -Werte der potentiellen TAR-Liganden	103
10	<i>Zusammenfassung</i>	105
11	<i>Ausblick</i>	108
12	<i>Experimenteller Teil</i>	109
12.1	Allgemeine experimentelle Bedingungen.....	109
13	<i>Monomerbausteine und Tripeptide</i>	112
13.1	Synthese der Monomerbausteine	112
13.1.1	Synthese von (S,S)-Pseudoephedrin-glycinamid-Hydrat (66) und (R,R)-Pseudoephedrin-glycinamid-Hydrat (ent-66).....	112

13.1.2	Synthese von (<i>S,S,R</i>)-Pseudoephedrin-allylglycinamid (67) und (<i>R,R,S</i>)-Pseudoephedrin-allylglycinamid (ent-67).....	113
13.1.3	Synthese von N-Cbz-(<i>S,S,R</i>)-Pseudoephedrin-allylglycinamid (67.2)	115
13.1.4	Synthese von N-Cbz-(<i>S,S,R</i>)-Pseudoephedrin-2-pyridyl-propylglycinamid (68a).....	117
13.1.5	Synthese von N-Cbz-(<i>S,S,R</i>)-Pseudoephedrin-3-pyridyl-propylglycinamid (68b).....	118
13.1.6	Synthese von N-Cbz-(<i>S,S,R</i>)-Pseudoephedrin-2-pyrimidinyl-propylglycinamid (68c).....	119
13.1.7	Synthese von N-Cbz-(<i>S,S,R</i>)-Pseudoephedrin-5-pyrimidinyl-propylglycinamid (68d).....	120
13.1.8	Synthese von N-Cbz-(<i>S,S,R</i>)-Pseudoephedrin-pyrazinyl-propylglycinamid (68e).....	121
13.1.9	Synthese von (<i>R</i>)-2-Pyridyl-propylglycin (69a).....	122
13.1.10	Synthese von (<i>R</i>)-Pyrazinyl-propylglycin (69e).....	123
13.1.11	Synthese von N-Fmoc-(<i>R</i>)-2-Pyridyl-propylglycin (70a).....	125
13.1.12	Synthese von N-Fmoc-(<i>R</i>)-D-Pyrazinyl-propylglycin (70e) und N-Fmoc-(<i>S</i>)-L-Pyrazinyl-propylglycin (ent-70e).....	126
13.1.13	Synthese von N-Fmoc-(<i>R</i>)-D-3-Pyridyl-propylglycin (70b).....	128
13.1.14	Synthese von N-Fmoc-(<i>R</i>)-D-2-Pyrimidinyl-propylglycin (70c).....	129
13.1.15	Synthese N-Fmoc-(<i>R</i>)-D-5-Pyrimidinyl-propylglycin (70d)	130
13.1.16	Synthese von (E)-3-Ethoxyacryloylchlorid	132
13.1.17	Synthese von N-(4-Bromphenyl)-(E)-3-ethoxyacrylamid (73)	133
13.1.18	Synthese von 6-Brom-1H-chinolin-2-on	134
13.1.19	Synthese von 6-Brom-2-chlorchinolin	135
13.2	Synthese der Tripeptide.....	136
13.2.1	Allgemeine Versuchsvorschrift für die Herstellung der Tripeptide (84) bis (108) mittels Fmoc-Festphasen-Synthese	136
13.2.2	Synthese des Tripeptids CONH ₂ -D-Arg-D-Arg-D-ArgNH ₂ (90)	136
13.2.3	Abspaltung des Tripeptids und der Schutzgruppen vom Harz.....	137
13.2.4	Synthese des Tripeptids CONH ₂ -D-Arg-D-2pyridyl-D-ArgNH ₂ (84) ...	138
13.2.5	Synthese des Tripeptids CONH ₂ -D-Arg-D-3pyridyl-D-ArgNH ₂ (85) ...	138
13.2.6	Synthese des Tripeptids CONH ₂ -D-Arg-D-2pyrim-D-ArgNH ₂ (86)	139

13.2.7	Synthese des Tripeptids $\text{CONH}_2\text{-D-Arg-D-pyrazinyl-D-ArgNH}_2$ (87) ..	139
13.2.8	Synthese des Tripeptids $\text{CONH}_2\text{-D-Arg-L-pyrazinyl-D-ArgNH}_2$ (88) ..	140
13.2.9	Synthese des Tripeptids $\text{CONH}_2\text{-D-Arg-D-Arg-D-2pyrimNH}_2$ (89)	140
13.2.10	Synthese des Tripeptids $\text{CONH}_2\text{-L-Arg-L-Arg-L-ArgNH}_2$ (91)	141
13.2.11	Synthese des Tripeptids $\text{CONH}_2\text{-D-Arg-D-Phe-D-ArgNH}_2$ (92)	141
13.2.12	Synthese des Tripeptids $\text{CONH}_2\text{-L-His-L-His-L-HisNH}_2$ (93)	142
13.2.13	Synthese des Tripeptids $\text{CONH}_2\text{-D-Arg-D-Trp-D-ArgNH}_2$ (94)	142
13.2.14	Synthese des Tripeptids $\text{CONH}_2\text{-D-Arg-D-Tyr-D-ArgNH}_2$ (95)	143
13.2.15	Synthese des Tripeptids $\text{CONH}_2\text{-D-Arg-D-Arg-D-TrpNH}_2$ (96)	143
13.3	Synthese der durch Inkubationen identifizierten Tripeptide	144
13.3.1	Synthese des Tripeptids $\text{CONH}_2\text{-D-2pyridyl-D-3pyridyl-D-ArgNHAc}$ (97)	144
13.3.2	Synthese des Tripeptids $\text{CONH}_2\text{-L-Phe-L-Arg-L-Phe NHAc}$ (98)	145
13.3.3	Synthese des Tripeptids $\text{CONH}_2\text{-L-Asn-D-2pyrim-D-2pyridylNHAc}$ (99)	145
13.3.4	Synthese des Tripeptids $\text{CONH}_2\text{-L-Phe-L-His-L-ArgNHAc}$ (100)	146
13.3.5	Synthese des Tripeptids $\text{CONH}_2\text{-L-Phe-D-Arg-L-LysNHAc}$ (101)	146
13.3.6	Synthese des Tripeptids $\text{CONH}_2\text{-L-His-L-His-L-HisNHAc}$ (102)	147
13.3.7	Synthese des Tripeptids $\text{CONH}_2\text{-D-Lys-D-Arg-D-ArgNHAc}$ (103)	147
13.3.8	Synthese des Tripeptids $\text{CONH}_2\text{-D-2pyridyl-D-2pyridyl-D-2pyrimNHAc}$ (104)	148
13.3.9	Synthese des Tripeptids $\text{CONH}_2\text{-L-Phe-D-2pyrim-D-2pyridylNHAc}$ (105)	148
13.3.10	Synthese des Tripeptids $\text{CONH}_2\text{-L-Leu-D-Arg-D-ArgNHAc}$ (106)	149
13.3.11	Synthese des Tripeptids $\text{CONH}_2\text{-L-Arg-D-Arg-L-PheNHAc}$ (107)	149
13.3.12	Synthese des Tripeptids $\text{CONH}_2\text{-D-Lys-D-Arg-L-PheNHAc}$ (108)	150
14	Stöchiometrie von Tat-RNA-Komplexen	151
14.1	Herstellung von HIV-1 TARwt	151
14.2	Bestimmung von Bindungskonstanten	152
14.3	Allgemeine Vorschrift zur Titration des Tat-Peptids mit RNA am Beispiel der HIV-1 TARwt-RNA	153
14.4	Titration des Tat-Peptids mit tRNA	156

14.5	Titration des Tat-Peptids mit der TAR <i>bulgeless</i> -RNA (HIV-1)	158
14.6	Titration des Tat-Peptids mit der TAR-RNA (HIV-2).....	159
14.7	Bestimmung der IC ₅₀ Werte für die synthetisierten Peptide	162
14.7.1	Bestimmung der Loop-Affinität anhand des TAR <i>bulgeless</i> -Assays ...	166
15	Experimentelle Daten der kombinatorischen Bibliotheken	167
15.1	Herstellung der 4096er Bibliothek (II)	167
15.1.1	Acetylierung der Bibliothek	172
15.1.2	Abspaltung der Schutzgruppen.....	172
15.2	Inkubation der 4096er Bibliothek (II).....	176
15.2.1	Inkubation der 4096er Bibliothek (II) mit Fluorescein-markierter TARwt-RNA (TARwt-RNA <i>fl</i>).....	176
15.3	Inkubation mit RNA Mutanten	179
15.3.1	Inkubation der 4096er Bibliothek (II) mit Fluorescein-markierter TAR <i>bulgeless</i> -RNA (TAR <i>bl</i> -RNA <i>fl</i>).....	179
15.3.2	Inkubation der 4096er Bibliothek (II) mit Fluorescein-markierter Bcr-Abl-mRNA (Bcr-Abl-mRNA <i>fl</i>).....	181
15.3.3	Inkubation der 4096er Bibliothek (II) mit Fluorescein-markierter ψ-RNA (ψ-RNA <i>fl</i>)	182
15.4	Herstellung der 343er Bibliothek.....	184
15.5	Inkubation der 343er Bibliothek mit verschiedenen RNAs	186
15.6	Inkubation der 343er Bibliothek mit der TARwt-RNA <i>fl</i>	186
15.7	Inkubation der 343er Bibliothek mit RNA Mutanten	188
15.7.1	Inkubation mit der TAR <i>loopless</i> -RNA <i>fl</i> (TAR <i>ll</i> -RNA <i>fl</i>).....	188
15.7.2	Inkubation der 343er Bibliothek mit der TAR <i>bulgeless</i> -RNA <i>fl</i> (TAR <i>bl</i> -RNA <i>fl</i>).....	189
15.7.3	Inkubation der 343er Bibliothek mit dem T ₁₀ <i>fl</i> -Linker	192
15.7.4	Inkubation der 343er Bibliothek mit der TARwt-RNA <i>fl</i> (TARwt-RNA <i>fl</i>) in Gegenwart von CONH ₂ -L-His-L-His-L-HisNH ₂ (100 eq)	192
15.7.5	Inkubation der 343er Bibliothek mit TARwt-RNA <i>fl</i> im Medium 40 : 60 MeOH:TK Puffer.....	193

15.7.6	Inkubation der 343er Bibliothek mit TAR wt -RNA fl in Gegenwart einer erhöhten Salzkonzentration	195
15.7.7	Inkubation der 343er Bibliothek mit TAR wt in Gegenwart von D-Arg-D-Arg-D-Arg (100 eq)	196
16	Anhang.....	198
16.1	Literaturverzeichnis	198
16.2	Abkürzungsverzeichnis	207
16.3	Lebenslauf.....	209
16.4	Publikationsverzeichnis.....	210

1 Einleitung

Ein großer Anteil der heutigen Medikamente zur Behandlung von Krebs und Infektionen zielt auf Proteine mit entsprechender pathologischer Wirkung, wie z. B. Kinasen.^{[1],[2]} Im Vergleich dazu ist RNA als therapeutisches Target eher unterrepräsentiert und hat erst in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen.^{[3],[4]} Im Gegensatz zur DNA kann sich die RNA in unzählige sekundäre und tertiäre Strukturen falten, die für diverse Funktionen innerhalb der Zelle verantwortlich sind. Neben der Rolle als passiver Informationsträger für die Übersetzung der DNA in Proteine hat die RNA vor allem regulatorische Funktionen. In den meisten Fällen wird die RNA von RNA-bindenden Proteinen begleitet, die zur Stabilisierung oder zum Transport beitragen. Desweiteren können diese Proteine die Wechselwirkung von RNA mit anderen Biomolekülen vermitteln oder auch katalytische Wirkung zeigen.^[5] Die Strukturaufklärung von RNA und RNA-Protein-Komplexen hat zur Entschlüsselung verschiedenster Arten von Interaktionen beigetragen.^{[6],[7]} Die Interaktion von Biomolekülen und synthetischen Wirkstoffen mit der RNA ermöglicht somit eine Beeinflussung der biologischen Funktion. Diese kann sich in einer veränderten Bindung von RNA mit Effektormolekülen, Inhibierung der RNA-Katalyse oder konformativen Veränderungen äußern.^{[8],[9],[10],[11],[12]} Die Fähigkeit kleiner Moleküle, spezifisch mit RNA zu interagieren wird bereits seit einiger Zeit auf dem Sektor der Anti-Infektiva genutzt. Durch die Bindung von Glykosid-Antibiotika an die ribosomale RNA (rRNA) von Prokaryoten wird die Translation in die entsprechenden Proteine beeinflusst. Aminoglykoside binden hierbei an die RNA der kleinen ribosomalen Untereinheit der 16S rRNA. Kanamycin, Gentamicin und Neomycin zählen zu den sehr gut untersuchten Antibiotika und entfalten ihre antimikrobielle Wirkung dadurch, daß sie ein fehlerhaftes Ablesen des genetischen Codes induzieren. Als Folge verlieren die funktionellen Proteine ihre Wirkung, wobei es gleichzeitig zu einer Anreicherung abnormer Proteine in der bakteriellen Membran und schließlich zum Zelltod kommt.

RNA-Protein-Wechselwirkungen sind auch bei einigen pathogenen Viren für das Überleben essentiell und somit ein interessanter Angriffspunkt für die Inhibierung der Genexpression mit synthetischen Molekülen. Beispiele hierfür sind der *human immunodeficiency virus* (HIV) oder der *Hepatitis C Virus* (HCV).

Für eine Reihe von Viren konnte mittels genetischer Studien eindeutig belegt werden, daß bestimmte RNA-Abschnitte für RNA Transkription und Protein-Translation essentiell sind. Die meisten RNA Elemente, die an der viralen Replikation beteiligt sind, entfalten ihre Wirkung durch hoch konservierte Stem-loop Einheiten, die bevorzugt in der kodierenden Region des viralen Genoms lokalisiert sind. Eine Mutation in dieser hoch konservierten Struktur des Virus führt in den meisten Fällen zu einer Fehlfaltung der RNA und damit zu einer Fehlfunktion oder Inaktivierung. Auf der anderen Seite führt die fehlende "Lesekontrolle" der Polymerasen bei RNA Viren zu einer hohen Mutationsrate.^[13] Es ist daher von entscheidender Bedeutung, daß bei der Target-Wahl eine RNA-Region mit hoch konservierter Struktur gewählt wird, um die Gefahr von Resistenzentwicklungen gegen einen Wirkstoff zu minimieren. Eine Vielzahl von RNA Targets enthält Stem-loop Strukturen, die kombiniert mit internen Loops oder Bulges auftreten. Ein Beispiel hierfür ist die TAR-RNA (*transactivating responsive element*, TAR) des HIV-1. Diese 59 nt große Region am 5' Ende der LTR-Region (*long terminal repeats*, LTR) interagiert mit dem Protein Tat, wodurch die virale Genexpression reguliert wird.^{[14],[15]}

Ein weiteres RNA-Target des HIV-1 ist das *Rev-responsive Element* (RRE). Es zeichnet sich durch eine große Anzahl von Stem-Regionen aus, die mit 5 Stem-loop-Strukturen vereint sind. Das Rev-Protein^[16] dient als Shuttle für den Transport der RNA vom Kern in das Cytoplasma. Beide RNA-Elemente sind daher wertvolle und intensiv untersuchte Targets für die Entwicklung antiviraler Therapeutika.^{[17],[18]}

Bei der HCV-IRES (*internal ribosomal entry site*, IRES) handelt es sich um eine weitere RNA-Struktur, die inzwischen als antivirales Target anerkannt ist.^[19] Für die Aktivierung des Translations-Prozesses ist die hoch konservierte 345 nt Region der RNA verantwortlich, die am 5' Ende lokalisiert ist.

Ein wichtiger Aspekt bei der Suche nach viralen RNAs als Angriffspunkt für eine antivirale Therapie ist die Identifizierung individueller, funktioneller Target-RNAs innerhalb eines großen Genoms. Eine Bedingung für die erfolgreiche Entwicklung von RNA-Inhibitoren ist hierbei, daß das selektierte RNA-Motiv seine biologische Funktionalität auch nach Separierung benachbarter Strukturen beibehält. Die Untersuchungen von TAR und HCV-IRES konnten hierbei wesentliche Beiträge bei der Suche nach individuellen Subdomänen leisten. Aus ihren Untersuchungen ging hervor, daß man durch Design von Peptiden oder kleinen Molekülen in der Lage ist,

die für den Virus essentiellen RNA-Protein-Wechselwirkungen zu unterbinden.^[15] Beim Design eines potentiellen peptidischen RNA-Liganden sollten jedoch mehrere Anforderungen erfüllt sein. Neben der Fähigkeit zur Ausbildung von Wasserstoff-Brückenbindungen sind eine gute Protonierbarkeit und auch Stacking-Interaktionen von hoher Bedeutung. Letztere werden durch aromatischen Funktionen des Liganden vermittelt. Da die Anzahl der aromatischen Aminosäuren sehr limitiert ist, ist die Fähigkeit zur Stacking-Wechselwirkung in peptidischen RNA-Liganden jedoch sehr unterrepräsentiert. Im Rahmen dieser Arbeit war es daher zunächst das Ziel, den Zugang zu neuen nicht-natürlichen Aminosäuren mit heteroaromatischer Seitenkette zu etablieren und deren Anzahl zu erweitern. Nach dem Test der Kompatibilität dieser Aminosäuren für die Verwendung in kombinatorischen Tripeptid-Bibliotheken und ersten Bindungsstudien mittels eines modifizierten *in vitro* TAR-RNA Assays sollte die Liganden-Suche für RNA durch Einsatz der kombinatorischen Chemie ausgedehnt werden. Neben dem Screening der TAR-RNA des HIV-1 sollte die Tripeptid-Bibliothek auch hinsichtlich ihrer potentiellen Bindungseigenschaften gegenüber weiteren RNA-Zielstrukturen wie der ψ -RNA des HIV-1 und der mRNA des bcr-abl-Gens untersucht werden. Während die Struktur der ψ -RNA seit einiger Zeit bekannt ist, handelt es sich bei der Bcr-Abl-mRNA um ein neues Target, dessen Sekundär-Struktur bislang noch nicht beschrieben wurde. Durch das Liganden-Screening sollte daher auch eine Adressierung von neuen unbekannten RNA-Sekundärstrukturen erfolgen.

2 Eigenschaften des HI-Virus und Ansatzpunkte zur Bekämpfung

Ende 2003 lebten ca. 40 Millionen Menschen – 37 Millionen Erwachsene und 2.5 Millionen Kinder unter 15 Jahren – weltweit mit HIV/AIDS.^[20] Für 2003 bedeutete dies einen Anstieg auf 5 Millionen Neuinfektionen, ca. 14 000 Infektionen pro Tag. Mehr als 95 % davon waren in den Entwicklungsländern zu verzeichnen. Aufgrund der hohen Mutationsrate des Virus, ist es bis heute nicht gelungen, einen geeigneten Impfstoff zu entwickeln. Trotz allem konnte jedoch, die Lebenserwartung HIV-infizierter Patienten durch Kombinationstherapien deutlich verbessert werden.^[21] Im Folgenden wird die Wirkung des HI-Virus 1 beschrieben und verschiedene Angriffspunkte zur Bekämpfung aufgezeigt. Hierbei soll auch auf die am Markt befindlichen Medikamente und Kombinationstherapien eingegangen werden.

2.1 Die Replikation des HI-Virus

Das *Acquired immune deficiency syndrome* (AIDS) zeichnet sich durch einen starken Rückgang von CD4⁺ T-Lymphozyten aus. Der Verlust dieser Zellen führt zu einer Schwächung des Immunsystems, erhöhten Anfälligkeit gegenüber Infektionen, körperlich bedingten Krankheiten und neurologischen Komplikationen.

HIV-1 ist ein komplexer Retrovirus, der aus der Familie der Lentiviren stammt.^[22] Außer den Genen gag, env und pol, die alle Retroviren aufweisen, enthält er sechs weitere regulierende Gene: nef, rev, tat, vif, vpr und vpu. Tat ist für die Transkription von der HIV-1 LTR essentiell, wohingegen Rev für den Transport viraler RNAs vom Zellkern in das Cytoplasma verantwortlich ist. Vpu, Vif, Vpr und Nef werden als „Hilfsproteine“ bezeichnet, da sie nicht explizit für die Virus-Replikation notwendig sind.

Die Struktur des Virus ist in Abb. 2.1 dargestellt. Alle Lentiviren sind von einer Lipid-Doppelschicht umgeben. Auf dieser Schicht befindet sich das Oberflächenprotein gp120, welches über das gp41 (Transmembranprotein) mit der Membran verbunden ist. Die Innenseite der Membran wird durch das Protein p17 abgegrenzt, wohingegen das Capsid-Protein p24 im Zentrum des Virus anzutreffen ist. Es umschließt zwei Kopien des ungespleißten viralen Genoms, welches durch einen Ribonucleoprotein-Komplex mit Nucleocapsidprotein p7 stabilisiert wird. Außerdem sind drei essentielle viral kodierte Enzyme vorhanden: Protease (PR), Reverse Transkriptase (RT) und

Integrase (IN). Desweiteren enthält der Viruspartikel die Hilfsproteine Nef, Vif und Vpr. Zur Zeit wird davon ausgegangen, daß die Proteine Rev, Tat und Vpu nicht im Virus verpackt sind, sondern erst nach einer erfolgreichen Infektion in der Wirtszelle gebildet werden. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß die Proteine möglicherweise nur in sehr geringen Konzentrationen vorliegen und deshalb bislang nicht nachgewiesen werden konnten.

Die HIV Replikation erfolgt in einer Art Kaskade, die man in eine „frühe“ und eine „späte“ Phase einteilen kann (Abb. 2.2).

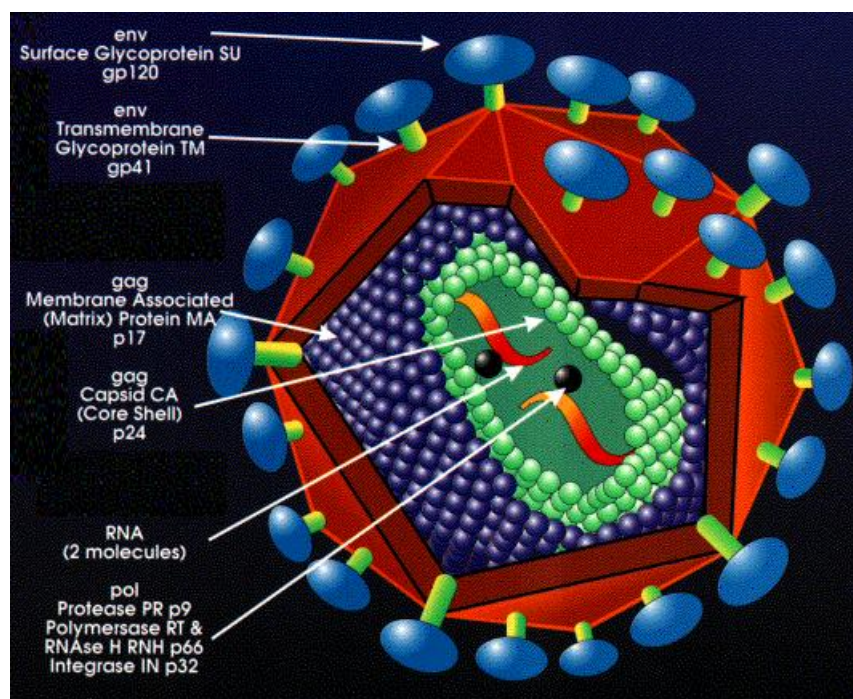


Abb. 2.1: Struktur des HI-Virus

2.1.1 Frühe Phase

Die HIV-Partikel binden spezifisch an Zellen, die einen CD4 Rezeptor tragen, ein Protein, welches normalerweise eine große Rolle bei der Immunantwort spielt. Die Bindung erfolgt über das virale Hüllprotein gp120 (Glycoprotein) und die aminoterminal Immunoglobulin-Domäne des CD4. Diese Wechselwirkung ist hierbei nur für die Bindung, nicht jedoch für eine Infektion der Immunzellen ausreichend. Im Gegensatz zu anderen Retroviren bedarf es zur erfolgreichen Infektion weiterer Oberflächenproteine, die eine Fusion zwischen beiden Membranen vermitteln. Bei HIV-1 sind hierfür die Chemokin-Rezeptoren (CXCR4 und CCR5) verantwortlich. Der

Membranfusion folgt ein Entmantelungsprozeß, der noch weitgehend unbekannt ist. Die reverse Transkription wird im Cytosol von der Reversen Transkriptase (RT) katalysiert. Die RT-abhängige DNA Synthese benötigt ebenfalls die viralen NC Proteine und wird durch die Bindung des zellulären $tRNA^{Lys}$ Primers eingeleitet. Nach Synthese der viralen DNA wird diese als Teil eines Preintegrations-Komplexes (IN, MA, RT, Vpr) in den Zellkern transportiert. Nach diesem aktiven Transport erfolgt die kovalente Integration der viralen DNA in das Genom durch die Integrase.

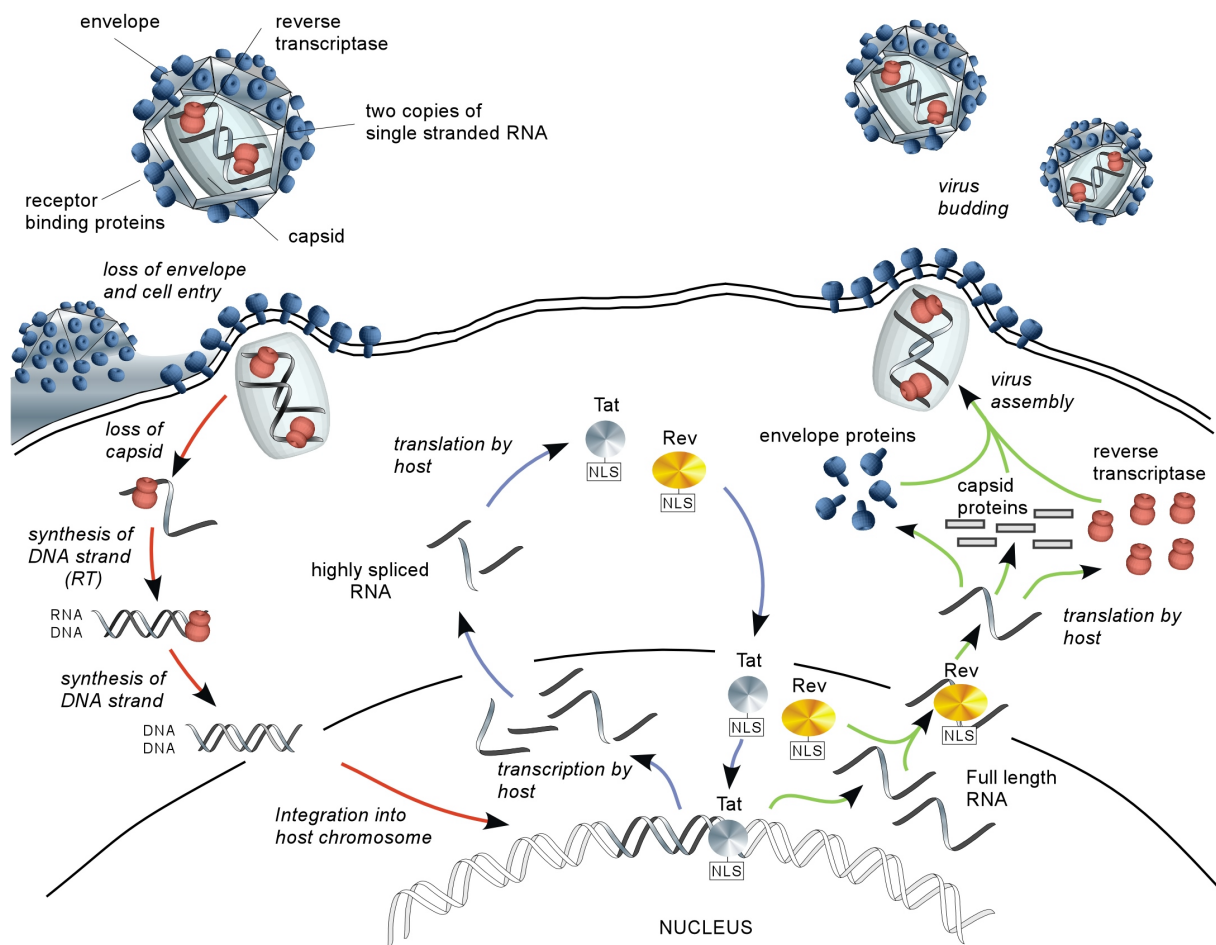


Abb. 2.2: Lebenszyklus des HIV ^[4b]

2.1.2 Späte Phase

Die späte Phase des Virus-Lebenszyklus beginnt mit der Synthese von gespleißten und ungespleißten *mRNA*-Transkripten, die für die anschließende Translation aus dem Kern transportiert werden. Zu Beginn werden die gespleißten Tat, Rev und Nef kodierenden Transkripte synthetisiert.

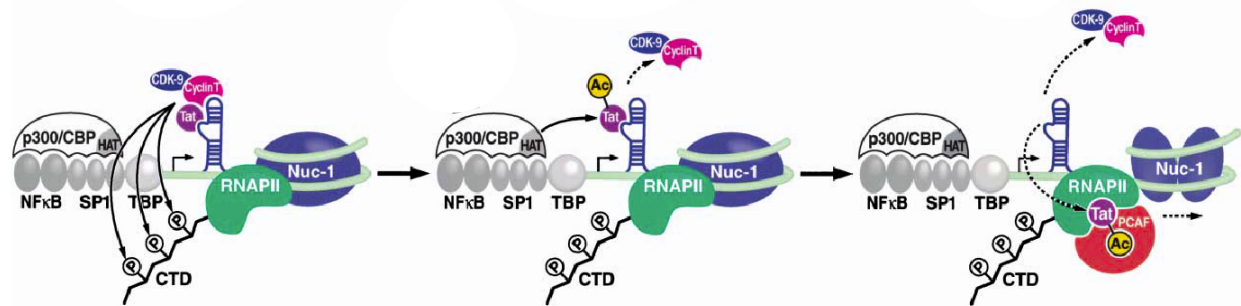


Abb. 2.3: Tat-Acetylierung als molekularer Schalter zwischen früher und später Phase^[24]

Das Tat-Protein ist der entscheidende virale Transkriptions-Aktivator, der an eine RNA-Stem-loop-Struktur (TAR) bindet, die am 5' Terminus aller Transkripte lokalisiert ist. In Abwesenheit von Tat ist die HIV-Transkription sehr ineffizient, da der angelagerte RNA-Polymerase II-Komplex keine ausreichende Elongation am viralen DNA-Templat ausführen kann. Als Resultat ergeben sich Abbruchsequenzen der *mRNA*. TAR stellt eine hoch-konservierte Struktur dar, die eine 3 nt große Bulge Region und einen 6 nt großen Loop-Bereich aufweist. Die Arginin-reiche Domäne des Tat-Proteins ist ebenfalls hoch-konserviert und dient als TAR-RNA Bindungsmotiv. Die Bindung von Tat an die TAR RNA wird durch die 3 nt Bulge Region (UCU) vermittelt, wohingegen die Loop-Sequenz den Tat-Cofaktor CyclinT1 (Komponente des P-TEFb, *positive-acting transcription elongation factors*) rekrutiert. Es wird hierbei angenommen, daß die Interaktion von Tat mit CyclinT1 eine konformative Umlagerung in Tat bewirkt, der für die Ausbildung dieses ternären Komplexes maßgeblich ist.^[23] An diesen Komplex lagert sich CDK9 an, das zu einer Hyperphosphorylierung der C-terminalen Domäne der RNA-Polymerase II führt und damit zu einer erhöhten Polymerase Prozessivität beiträgt. Nach neuesten Untersuchungen geht man davon aus, daß das Tat-Protein anschließend von p300/CBP (Koaktivatoren mit Histon-Acetyltransferase-Aktivität) acetyliert wird, was zu einer

veränderten Affinität beiträgt. Tat verläßt den ternären Komplex und lagert sich direkt an die Polymerase II an (vgl. Abb. 2.3).^{[24],[25],[26]} Während die ungespleißte *mRNA* im Kern zurückbleibt, sind die Voll-Längen und einfach gespleißten HIV *mRNA* Transkripte mit funktionellen Introns im Cytoplasma vorhanden. Hier erfolgt die Synthese von Gag und Gag-Pol, sowie das „Packen“ des Virus, wobei das Protein Rev den Export des Virus vermittelt. Im Kern bindet Rev an die entstehende ungespleißte *mRNA* und rekrutiert das Protein XPO (cellular nuclear shuttling protein exportin-1) und Ran-Guanosin Triphosphatase (nuclear export factor). Dieser Komplex wird anschließend in das Cytosol transportiert, wo GTP zu GDP hydrolysiert wird. Im Ribosom wird ausgehend von der ungespleißten *mRNA* das Polyprotein Gag synthetisiert. Ein Frameshift bewirkt die Generierung von Gag-Pol-Vorläufer Proteinen, die mit dem Gag-Polyprotein an der Membran assoziieren. Die Wechselwirkung zwischen dem Gag-Protein und der HIV-1 ψ -RNA ist für die Verpackung des Virus essentiell. Die ψ -RNA ist eine hochstrukturierte Region am 5'untranslatierten Ende ungespleißter HIV-1 RNAs und für die Einkapselung zweier viraler RNAs maßgeblich beteiligt. Die spezifische Erkennung der viral genomischen ψ -RNA wird durch das Polyprotein Gag, bzw. die Untereinheit NCp7 vermittelt. Die gesamte ψ -Region besteht aus 120 nt, die vier individuelle Stem-loop Strukturen ausbilden (SL1-SL4). Obwohl alle vier Regionen an der Einkapselung des Virus beteiligt sind, ist SL 3 das Hauptelement des Verpackungs-Signals. Mittels NMR-spektroskopischer Untersuchungen konnte eine Wechselwirkung des Gag-Proteins mit dem GGAG-Tetraloop der SL3 nachgewiesen werden.^[27] Durch Varani et al. konnte außerdem gezeigt werden, daß die Sekundärstruktur entwunden wird.^[28] Da die Verpackung ein essentieller Schritt im Lebenszyklus des Virus ist, bietet die Unterdrückung der Gag-Protein- ψ -RNA Wechselwirkung einen Angriffspunkt für antivirale Therapeutika.^[29] Gleich nach der Abkapselung werden die Polyproteine von der Protease gespalten und bilden so unabhängige Enzyme, sowie das Matrix, Capsid und Nucleocapsid-Protein. Während der Reifung, ordnen sich die Struktur-Proteine an und bilden schließlich den infektiösen Viruspartikel.

2.2 Derzeitige Medikamente zur Behandlung von HIV

Zur Zeit sind drei Klassen antiretroviraler Medikamente auf dem Markt erhältlich.^{[30],[31],[32],[33]} Neben den Nucleosid/Nucleotid analogen (NRTIs) und nicht-nucleosidischen (NNRTIs) Transkriptase Inhibitoren, inhibieren einige Wirkstoffe

auch die Protease (PR). Inzwischen sind mehrere Medikamente zugelassen, von denen einige auch in Kombinationsbehandlungen verwendet werden. Die HAAR-Therapie (*high active antiretrovirale therapy*) beinhaltet die Anwendung einer Dreifachkombination, in der unterschiedliche chemische Klassen von RT und PR-Inhibitoren zum Einsatz kommen. Im März 2003 wurde in den USA der Prototyp einer neuen Klasse zugelassen, der Fusions-Inhibitor T-20. Eine Vielzahl von weiteren Wirkstoffen ist zur Zeit in klinischen Phasen und wird voraussichtlich innerhalb der nächsten zwei Jahren zugelassen werden. Im Folgenden wird kurz die Wirkungsweise der einzelnen Klassen vorgestellt, die bereits zugelassenen Medikamente sind in Tabelle 2.1 dargestellt.

Tab. 2.1: Medikamente zur HIV-Therapie

Nucleosid Reverse Transkriptase Inhibitoren	
Handelsname	Freiname
Combovir [®]	AZT+3CT
Epivir [®] (3CT)	Lamivudin
Hivid [®] (ddC)	Zalcitabin
Retrovir [®] (AZT)	Zidovudin
Trizivir [®]	AZT+3CT+ABC
Videx [®] (ddl)	Didanosin
Viread [®] (TDF)	Tenofovir
Zerit [®] (d4T)	Stavudin
Ziagen [®] (ABC)	Abacavir

Non-Nucleosid Reverse Transkriptase Inhibitoren	
Handelsname (Abk.)	Freiname
Rescriptor [®] (DLV)	Delavirdin
Sustiva [®] (EFV)	Efavirenz
Viramun [®] (NVP)	Nevirapin
Protease Inhibitoren	
Handelsname (Abk.)	Freiname
Agenerase [®] (APV)	Amprenavi
Crixivan [®] (IDV)	Indinavir
Fortovase [®] (SQV/SGC)	Saquinavir
Kaletra [®] (LPV)	Lopinavir
Norvir [®] (RTV)	Ritonavir
Viracept [®] (NFV)	Nelfinavir

2.2.1 Nucleosid Analoga

Angriffspunkt der Nucleosid-Analoga ist die Reverse Transkriptase. Nucleosid-Analoga müssen zuvor durch Phosphorylierung in die aktiven Triphosphat Derivate überführt werden. Sie agieren hierbei als Konkurrenten oder als „falsche Bausteine“ mit den physiologischen Nucleosiden und unterscheiden sich nur durch minimale Abweichungen in der Ribose-Einheit. Diese Modifikationen führen jedoch zu einem Abbruch der DNA-Synthese, da der Einbau von Phosphodiester-Brücken unterbunden wird.

2.2.2 Nicht-nucleosidische Reverse Transkriptase Inhibitoren

Wie die Nucleosid-Analoga inhibieren auch nicht-nucleosidische Wirkstoffe die Reverse Transkriptase. Im Gegensatz zu den NRTIs binden sie direkt und nicht-kompetitiv in einem Bereich an das Enzym, der als Bindungsstelle für die natürlichen Nucleoside dient. Der resultierende Komplex blockiert somit die Bindungsseite der Reversen Transkriptase, die folglich weniger Nucleoside binden kann, was die Polymerisation der DNA extrem behindert. Eine zusätzliche Aktivierung der NNRTIs in der Zelle ist - im Gegensatz zu den NRTIs - nicht nötig.

2.2.3 Protease Inhibitoren

Das virale Polyprotein gag-pol wird durch die HIV Protease in ihre funktionellen Untereinheiten gespalten. Durch Inhibierung der Protease wird die vollständige Reifung des Virus unterbunden, eine Infizierung weiterer Zellen wird somit verhindert.

2.2.4 Inhibierung des HIV-Eintritts

Eintritts-Inhibitoren können sowohl über den CD4 Rezeptor, als auch über die Corezeptoren wirken. Ein weiterer Ansatzpunkt ist, die Fusion des Virus mit der Wirtszelle zu verhindern.^[34] Die Wirkstoffe BMS-806 und Pro-542 greifen beide an das gp 120 des HIV an und verhindern damit die Bindung an die CD4 T-Lymphozyten. Zur Zeit befinden sich beide Kandidaten in fortgeschrittenen klinischen Studien. Als CCR5 Corezeptor-Antagonisten haben sich die Substanzen SCH-C, SCH-D und Pro-140 erwiesen. Auch diese Wirkstoffe befinden sich noch in klinischen Phasen.

Im letzten Jahr wurde das Medikament Fuzeon[®] (T-20, Enfuvirtide) in den USA zugelassen. Der peptidische Fusions-Inhibitor bindet an die Übergangsstruktur von gp41 und blockiert somit die Fusion des Virus mit der Wirtszelle.

2.3 Zukunftsperspektiven

Trotz des beispiellosen Erfolgs in der Therapie der HIV-Infektion gibt es bislang noch keinen vollständigen Heilungserfolg. Die Entstehung von Resistenzen unter den vielen verschiedenen Virus-Varianten und ernsthafte Nebenwirkungen limitieren die Effizienz der vorhandenen Therapien. Die hohe Variabilität des Virus verlangt daher sehr wahrscheinlich eine Kombination verschiedener Medikamente mit unterschiedlichen Wirkorten. Die HIV-Genregulation liefert ggf. neue vielversprechende Targets

unter der Voraussetzung, daß Inhibitoren mit entsprechender Spezifität identifiziert werden können. In den letzten Jahren konnten eine Reihe von Substanzen erfolgreich als Tat-TAR-Inhibitoren bestimmt werden (siehe Kapitel 3). Bislang konnte aber für keine der Verbindungen zweifelsfrei belegt werden, daß ihre antivirale Wirkung ausschließlich durch die Tat-TAR Inhibierung ausgelöst wird. Vielmehr konnte inzwischen für einige vermeintliche Tat-Antagonisten (ALX40-4C, CGP64222) auch die Wirkung als Virus-Eintrittshemmer (CXCR4) nachgewiesen werden.^{[35],[36]} Aus diesem Grund ist es unverzichtbar, geeignete Tat-TAR-Inhibitoren zu identifizieren. Eine Kombination solcher Inhibitoren mit bereits etablierten Therapie-Ansätzen und der Angriff auf verschiedene lebenswichtige Virusfunktionen sollte die Vermehrung des Virus zumindest eingrenzen. Die Informationen, die aus Ligand-TAR-RNA Interaktionen gewonnen werden, können zugleich bei der Aufklärung eines bevorzugten Bindungsmotivs von RNA und Liganden helfen. Im Kapitel 3 wird näher auf bekannte Tat-Antagonisten eingegangen.

3 TAR-Liganden

Die Tat-TAR-Interaktion erfolgt über einen induced-fit Mechanismus.^[37] Das Tat-Protein umfaßt 86 Aminosäuren und läßt sich in eine N- und C-terminale RNA-Bindungsdomäne einteilen.^{[38],[39]} Die minimale RNA-Bindungsdomäne (49-57) ist sehr Arginin-reich und essentiell für eine Interaktion mit der Bulge-Region der TAR-RNA. In Abwesenheit des Tat-Peptids zeigt die 3 nt große Bindungsdomäne der TAR-RNA eine hohe Flexibilität. Die Bindung des Tat-Proteins an die TAR-RNA bewirkt in beiden Strukturen eine konformationelle Änderung (siehe Abb. 3.1). Die Bildung eines Basentriplets aus U23:A27:U38 ist für die Bindung einiger Liganden wichtig. Stabilisierung wird hierbei sowohl durch Wasserstoffbrücken-Bindungen als auch durch Stacking-Wechselwirkungen mit den RNA Bindern erzeugt.^[40]

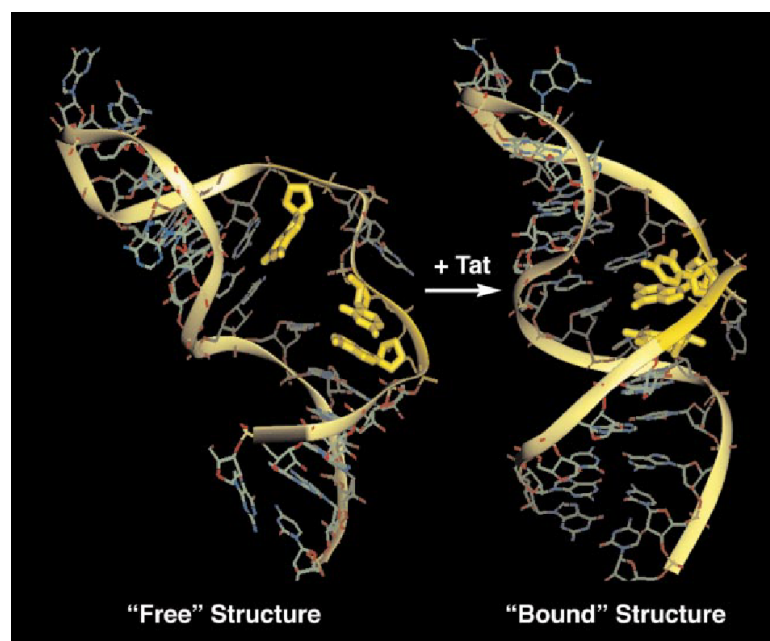


Abb. 3.1: TAR-RNA in freier und tat-gebundener Form^[22]

Inzwischen gibt es eine Vielzahl von TAR-Liganden. Im folgenden Kapitel werden aktuelle Fortschritte bei der Entwicklung von Tat-Antagonisten beschrieben.

Zur Kategorisierung der Verbindungen kann man drei Gruppen unterscheiden:

- „Aminoglykoside“
- „Small Molecules“ (low molecular weights compounds)
- „Peptidische Strukturen“

3.1 Aminoglykoside

1995 konnte von der Gruppe Mei et al. gezeigt werden, daß die Aminoglykoside Neomycin (**1**) (1µM), Streptomycin (**2**) (10µM) und Gentamycin (**3**) (45 µM) an die TAR-RNA des HIV-1 binden (Abb. 3.2).^[41] Die Abstufung der IC₅₀-Werte zeigt, daß die Stärke der RNA-Bindung, die durch elektrostatische Wechselwirkungen hervorgerufen wird, nicht von der Anzahl an positiven Ladungen im Molekül abhängig ist. Beispielsweise bindet Streptomycin fünfmal stärker an die TAR-RNA als Gentamycin, obwohl es im Vergleich zwei basische Zentren weniger aufweist.

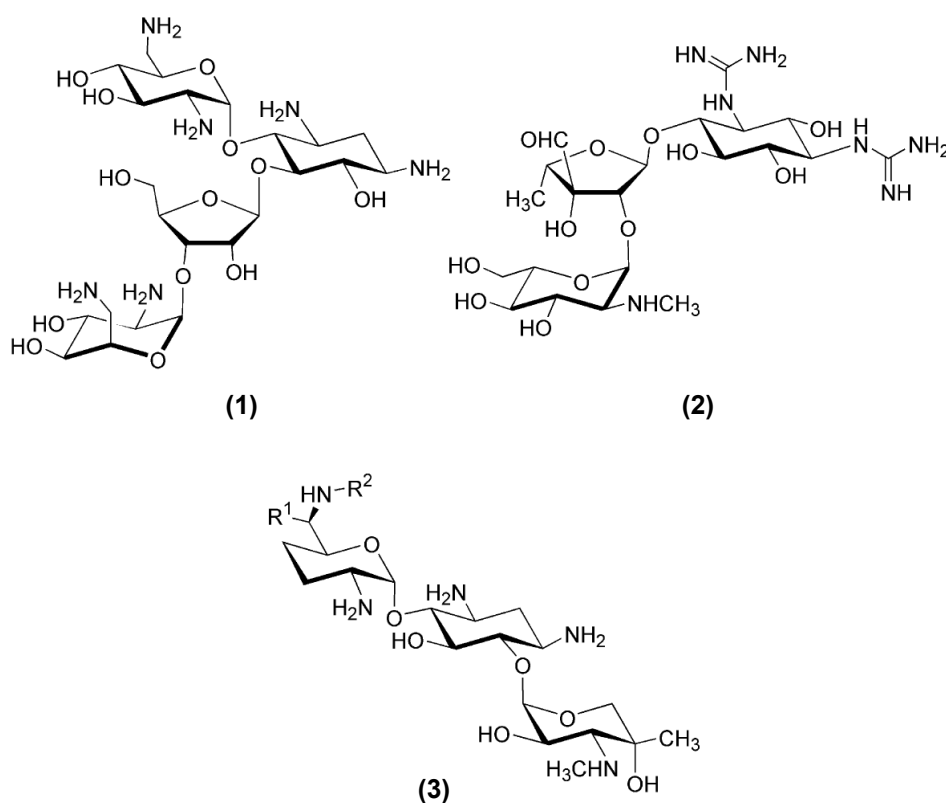


Abb. 3.2: Aminoglykoside als TAR-Liganden

Guanidiniumgruppen hingegen steigern die Affinität zur TAR. Durch den Einbau mehrerer Guanidine in Kanamycin A und Gentamicin C1 konnten signifikante biologische Aktivitäten in den Zellkulturen bewirkt werden.^{[42],[43]} Zur Aufklärung der Bindungsregion wurden neben Footprinting Experimenten in der Gruppen von Westhof et al. und Hermann et al. Docking-Studien durchgeführt.^[44] Für das Tat-Protein und Neomycin wurden hierbei unterschiedliche Bindungsstellen ermittelt, ganz im Einklang mit biochemischen und NMR-spektroskopischen Daten. Neomycin (**1**) inhibiert die Tat-TAR Wechselwirkung auf nichtkompetitivem Weg, wobei die RNA in ihrer Protein-freien Konformation blockiert wird.

3.2 Small Molecules

Zu dieser Gruppe zählen Moleküle bis zu einer Größe von 500 Da. In den vergangenen Jahren konnte eine begrenzte Anzahl nicht-peptidischer TAR-Binder identifiziert werden, vgl. Abb. 3.3. Zu den bekanntesten Liganden zählt ohne Frage Argininamid (**4**). 1992 wurde hierbei basierend auf NMR- und biochemischen Experimenten von Frankel et al. und Williamson et al. ein Argininamid-TAR-Komplex vorgeschlagen.^{[40],[45],[46],[47]} Bis heute ist Argininamid der am besten untersuchte TAR-Ligand. Durch die Bindung an der Bulgeregion wird eine Strukturänderung hervorgerufen, wobei vor allem mit der Base G26 Wasserstoff-Brückenbindungen ausgebildet werden. Diese Strukturänderung ist für viele tat-analogen Peptide charakteristisch. Von Bailly et al. wurde durch Circular Dichroismus und nachfolgenden Footprinting Experimenten die Verbindung Hoechst 33258 (**5**) als Intercalator im Bulgebereich (U40) identifiziert.^[48] Mittels eines *in vitro* Hochdurchsatz-Screenings entdeckten Mei et al. Verbindungen, die die Tat-TAR-Wechselwirkung inhibieren. Ausgehend von 150 000 Substanzen identifizierten sie zwei vielversprechende Kandidaten, das Chinoxalin (**6**, IC₅₀= 1.3 µM) und Tetraaminochinoxalin (**7**, 10 µM). Die Bindungsstellen dieser Moleküle innerhalb des TAR-Komplexes sind sehr unterschiedlich. Während Verbindung (**6**) in der Bulge-Region bindet, ist die Verbindung (**7**) eher am 3' Ende der TAR-loop lokalisiert.^[49] Eine andere Klasse von HIV-Antagonisten wurde von Hamy et al. publiziert.^[50] Die Verbindung zählt zu den sogenannten „In-PriNts“ (inhibitors of ribonucleotide sequences). Strukturell vereint die Verbindung drei verschiedene Komponenten. Zum einen ermöglicht der aromatische Anteil stacking-Wechselwirkungen, der kationische Rest soll hierbei zusätzlich durch die elektrostatischen Wechselwirkungen mit dem Phosphodiester-

rückgrat der RNA stabilisieren. Beide Bereiche werden hierbei durch eine Art Linker verbunden. Acridinderivate zeichneten sich im Vergleich zu anderen Heterocyclen durch hohe Bindungseigenschaften zur TAR-RNA aus. Als Oligo-kationische Komponente wurde das Spermidin gewählt, wobei die Linkerlänge variabel gewählt werden kann. Die Verbindung CPG 40336A (**8**) zeigte in einem *in vitro* Assay Kompetition des Tat-TAR Komplexes mit einem CD_{50} -Wert von 22 nM, in zellulären Assays wurden IC_{50} -Werte um 0.8 μ M erhalten. Durch NMR-Experimente konnte bestätigt werden, daß die Verbindung in der Bulge-Region der TAR-RNA bindet.

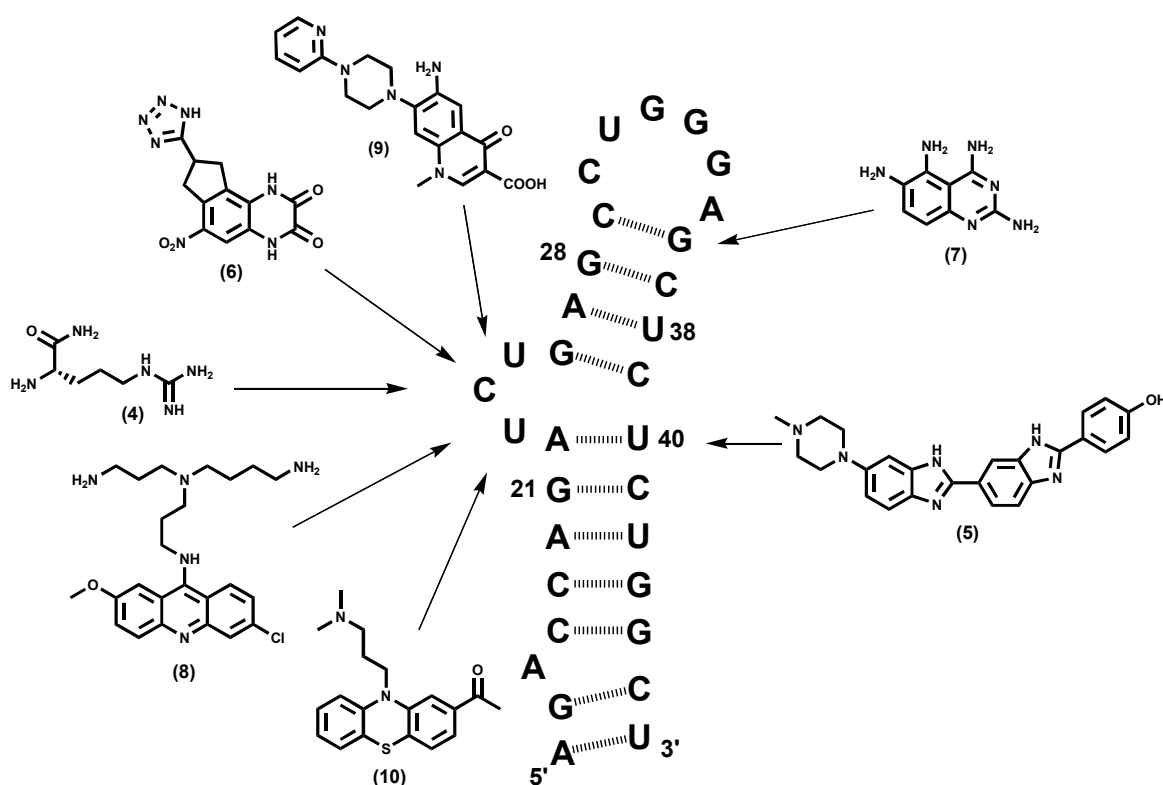


Abb. 3.3: TAR-bindende Moleküle

Kürzlich wurde von Palù et al. von einem antiviralen 6-Aminoquinolon Derivat (**9**) berichtet.^[51] In einem Zell-Assay (HL3T1) wurden in Gegenwart von 10 µM bzw. 5 µM (**9**) zwischen 77 % und 73 % Inhibierung der Tat-abhängigen Transaktivierung beobachtet. Die Spezifität der Verbindung zur TAR-RNA konnte durch Kontrollexperimente mit *ds*TAR, *t*RNA, *ss*DNA oder *ds*DNA belegt werden.

Bei einem virtuellen Screening wurden in der Gruppe von James et al. Phenothiazine als vielversprechende TAR-Inhibitoren identifiziert.^[52] Die Bindungskonstante von Acetylpromazin (**10**) lag bei 270 μ M (NMR-Studien). Untersuchungen mit weiteren RNAs wie z. B. der ribosomalen A-site und des Coxsackie Virus B3 Loop D zeigten

jedoch vergleichbare Bindungskonstanten, so daß nur von einer begrenzten Selektivität gegenüber RNA ausgegangen werden kann.^[53]

Ein weiterer vielversprechender TAR-Ligand ist die Verbindung rbt550 (**11**) (Abb. 3.4) mit nanomolarer Affinität. Der durch NMR, theoretische Strukturanalyse und Fluoreszenz-Assay identifizierte Ligand zeigte im zellulären Test einen IC₅₀-Wert im mikromolaren Bereich.^{[54],[55]}

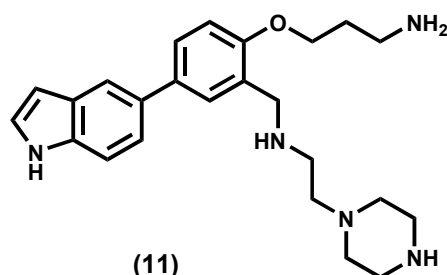


Abb. 3.4: Verbindung rbt 550 mit nanomolarer Affinität

3.3 Peptidische Strukturen

Während der letzten Jahre sind eine Reihe von peptidischen Verbindungen veröffentlicht worden, die spezifisch mit der Bulge-Region der HIV-TAR-RNA interagieren und damit die Replikation des Virus erheblich einschränken.

Das Peptoid/Peptid Nonamer CPG 64222 (**12**) wurde von Hamy et al. durch die Dekonvolution einer kombinatorischen Bibliothek identifiziert (Abb. 3.5).^[56] Das Nonamer bindet an die Bulge-Region der TAR-RNA und inhibierte die Tat-TAR-Wechselwirkung im Zellaassay in einem Konzentrationsbereich von 10-30 µM. Durch NMR-Studien des Komplexes TAR-CGP64222 konnte die Bindung des Peptoid/Peptid Nonamers in der Bulge Region lokalisiert werden. Demgegenüber wurde im Jahr 2000 von derselben Gruppe beschrieben, daß auf zellulärer Ebene der Virus-Eintritt in die Zelle durch die Wechselwirkung von CGP64222 mit dem Chemokin-Rezeptor CXRC4 inhibiert wird.^[36]

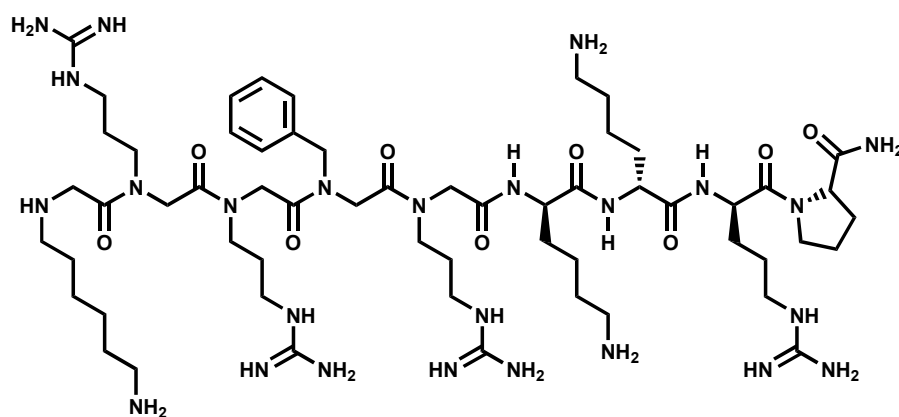
CGP 64222 (**12**)

Abb. 3.5: Peptoid CPG 64222, ein TAR-Ligand und Entry- Inhibitor

Rana et al. untersuchten den Einfluß der Stereochemie auf die RNA-Bindung und synthetisierten zu diesem Zweck D- und L- konfigurierte Analoga des Tat-Peptids (Abb. 3.6).^[57] Überraschenderweise bindet das L-Tat-Peptid ($K_D = 0.13 \mu\text{M}$) nur mit leicht erhöhter Affinität im Vergleich zum D-Tat-Peptid ($K_D = 0.22 \mu\text{M}$). Desweiteren wurden von derselben Gruppe Carbamat und Harnstoff-Analoga synthetisiert.^[58] Die Sequenz der Moleküle entsprach hierbei der des Tat-Peptids. Das Oligoharnstoff-derivat (**14**, $K_D = 0.11 \mu\text{M}$) wies eine zehnfach höhere Bindungsaffinität als das Oligocarbamat (**13**, $K_D = 1.1 \mu\text{M}$) auf (Abb. 3.7).



Abb. 3.6: Die Sequenz des Tat-Peptids

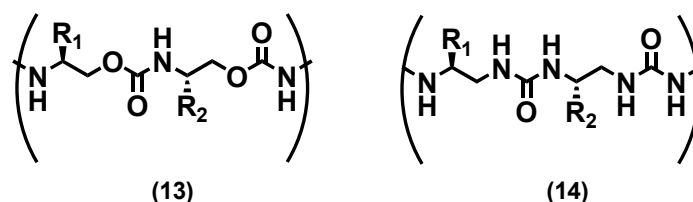


Abb. 3.7: Die Strukturen der Oligoharnstoff- und Oligocarbamat-Derivate

Desweiteren wurden Ester und Amid-Analoga synthetisiert, die eine Protease-Degradierung minimieren sollten.^[59] Das Ester-Peptoid-Derivat **(15)**, welches das Strukturmotiv von Tat (47-57) aufwies, zeigte mit einem K_D -Wert von 0.068 μM (Fluoreszenz-Quenching) eine leicht höhere Affinität als das entsprechende Amid-Peptoid **(16)** (Abb. 3.8).

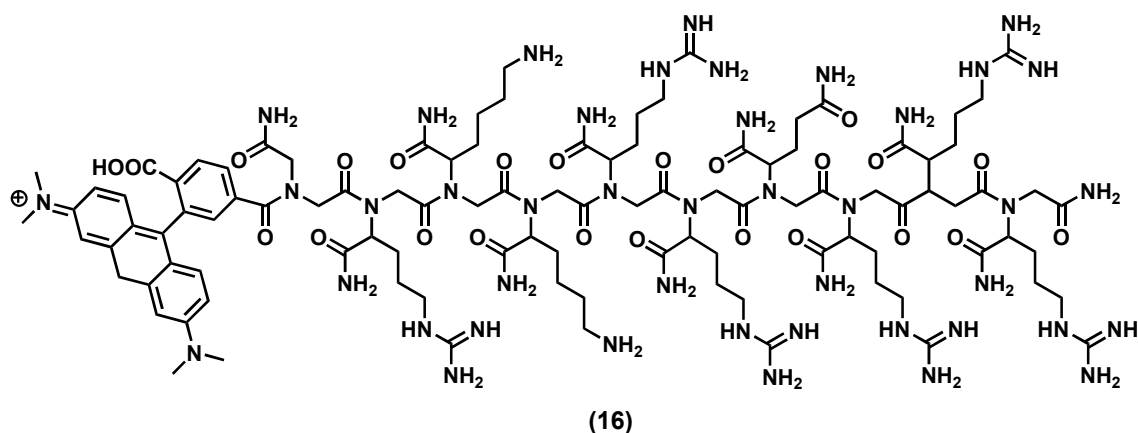
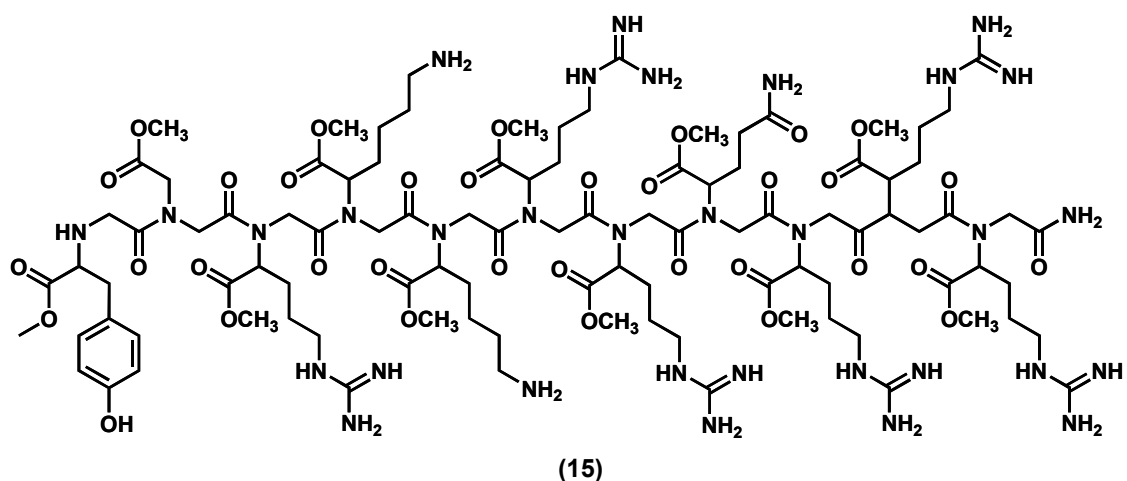


Abb. 3.8: Die Strukturen des Ester- und Amidpeptoids

Kurzkettige Peptide wurden von Rana et al. in einer 24389 Tripeptide umfassenden kombinatorischen Bibliothek untersucht.^[60] Die Bibliothek umfaßte sowohl D- als auch L-konfigurierte Aminosäuren. Aus dieser Bibliothek wurden acht vielversprechende Kandidaten als potentielle TAR-Liganden identifiziert. Es konnte ein bevorzugtes Strukturmotiv des Musters X-Lys-Asn gefunden werden. Die besten Binder waren $\text{NH}_2\text{-(L)Lys-(D)Lys-(L)-Asn-OH}$ (**17**, $K_D = 0.42 \mu\text{M}$) und $\text{NH}_2\text{-(D)Thr-(D)-Lys-(L)-Asn-OH}$ ($K_D = 0.56 \mu\text{M}$). Alle weiteren Peptide waren Diastereomere des $\text{NH}_2\text{-}$

Lys-Lys-Asn-OH und zeigten erheblich schlechtere Ergebnisse. Der Einfluß stereoselektiver Effekte bei der Wechselwirkung mit der RNA konnte damit bestätigt werden. Die Ergebnisse aus diesen Untersuchungen werden im Kapitel 9 noch einmal ausführlicher diskutiert. Der Einbau der Sequenz $\text{NH}_2\text{-(L)lys-(D)lys-(L)-Asn-OH}$ in ein zyklisches Peptid **(18)** trug allerdings nicht zur Affinitätssteigerung bei (Abb. 3.9).^[61]

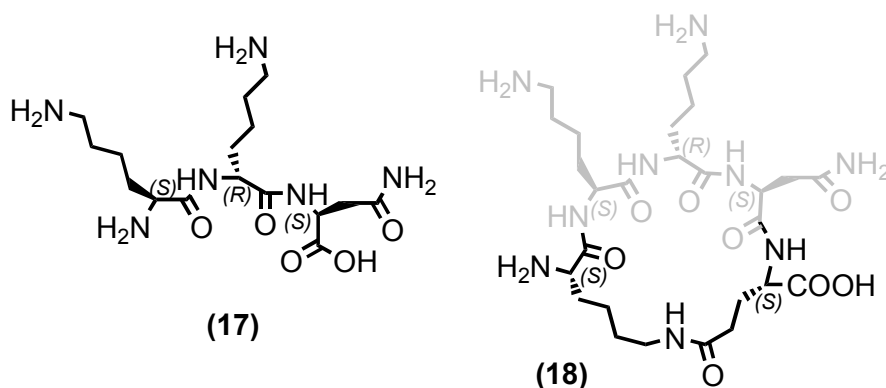


Abb. 3.9: Einbau des Tripeptids **(17)** in das zyklische Peptid **(18)**

Im Rahmen einer zweiten kombinatorischen Synthese wurde aus der Arbeitsgruppe von Rana et al. eine 39304 Moleküle umfassende kombinatorische Bibliothek publiziert.^[62] Ein Screening lieferte aus dieser Bibliothek 59 potentielle TAR-Liganden. Durch Struktur-Aktivitäts-Bestimmungen konnten 19 Verbindungen identifiziert werden, die eine hohe TAR-Affinität zeigten ($K_D < 200$ nM). Mit einem TAR-Binder **(19)** (Abb. 3.10) wurde im Zelltest über 24 Tage eine Unterdrückung der HIV-Replikation (5 μM) erzielt.

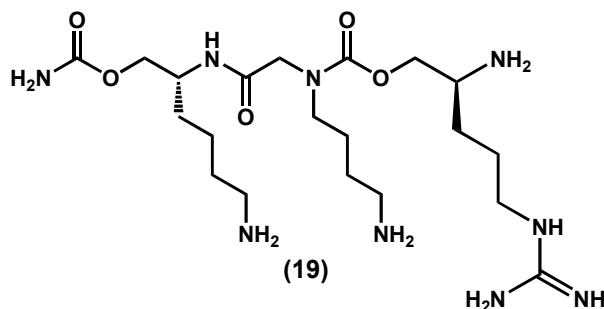


Abb. 3.10: Nanomolarer TAR-Ligand aus einer kombinatorischen Bibliothek von Rana et al.

4 Die *mRNA* des Bcr-Abl Proteins als neue RNA-Zielstruktur

Im vorangegangenen Kapitel wurde eine Vielzahl von Tat-TAR-Inhibitoren vorgestellt. Neben der Suche nach potentiellen Tat-Antagonisten sollte im Rahmen dieser Arbeit eine Ausweitung der Ligandensuche auf weitere RNA-Zielstrukturen erfolgen. Neben der ψ -RNA des HIV-1, wurde die *mRNA* des onkogenen Bcr-Abl Proteins gewählt. Der biologische Hintergrund wird in den folgenden Kapiteln dargestellt.

4.1 Das Bcr-Abl Protein als Auslöser der chronisch myeloischen Leukämie

Bcr-Abl ist ein chimeres Onkoprotein, welches aus der reziproken Translokation der Chromosomen 9 und 22 hervorgeht und ursächlich für die Pathogenese der Philadelphia (Ph)-positiven Leukämie ist. Während die native c-ABL Kinase hauptsächlich im Nucleus vorhanden ist und ihre Aktivität strikt reguliert wird, befindet sich das Fusionsprotein Bcr-Abl vorwiegend im Cytoplasma und ist als Tyrosinkinase dauerhaft aktiviert. Bcr-Abl agiert über die Bindung von ATP, phosphoryliert dabei Tyrosinreste anderer Kinasen und aktiviert dadurch multiple Signal-Transduktions-Kaskaden. Als Folge daraus ergeben sich starkes Zellwachstum sowie eine Blockierung des Apoptose-Mechanismus. Es konnte gezeigt werden, daß die erhöhte Tyrosin-Kinase Aktivität von Bcr-Abl für den Beginn und den Verlauf der chronisch myeloischen Leukämie (CML) verantwortlich ist. Im fortgeschrittenen Stadium der CML erfolgt der Übergang in die Blasten-Phase. Während die chronische Phase über einen längeren Zeitraum sehr gut behandelt werden kann, führt die Blastenkrise innerhalb von 6 bis 12 Monaten zum Tod. Es wird davon ausgegangen, daß sekundäre genetische Effekte zur Ausbildung der Blastenkrise führen.

4.2 Molekularer Hintergrund der Philadelphia Chromosom Translokation

Die molekulare Genetik der Philadelphia Chromosom Translokation ist inzwischen bekannt.^[64] Die t(9;22) Anomalie führt zu einem Austausch der DNA zwischen den Chromosomen 9 und 22. Das 3'-Ende des ABL Gens wandert vom Chromosom 9 zum Chromosom 22 und ist am BCR-Gen lokalisiert. Hieraus resultiert das chimere

BCR-ABL Gen. Die Translokationsbruchpunkte im BCR-Gen am Chromosom 22 variieren (Abb. 4.1).

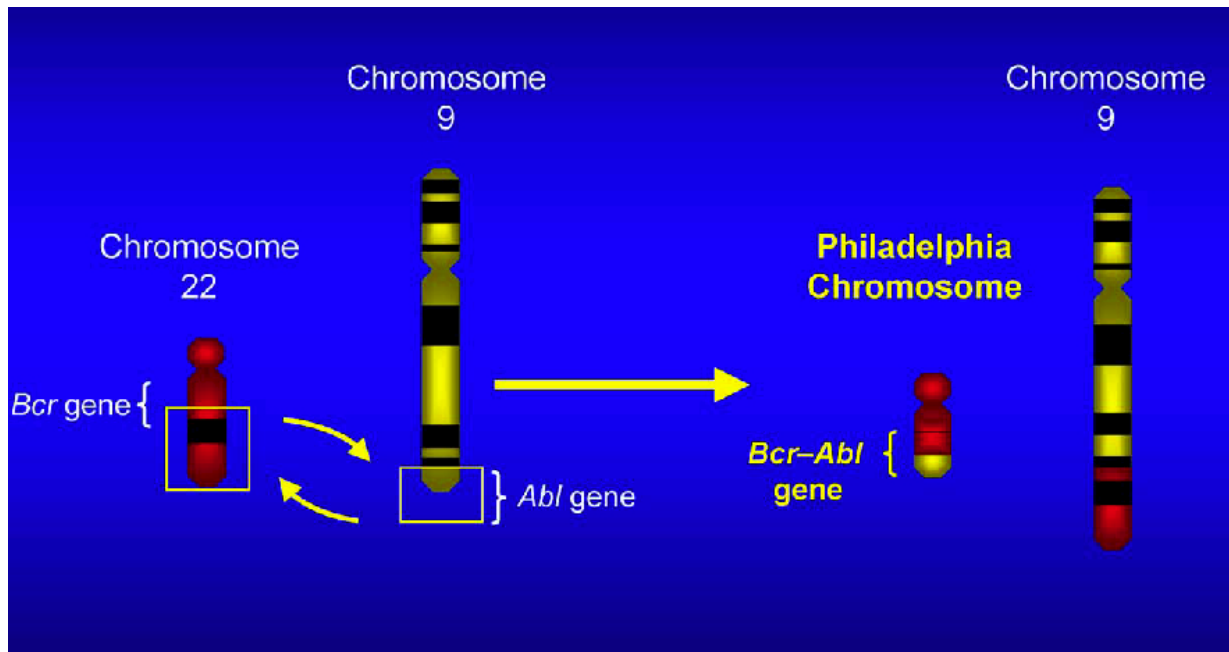


Abb. 4.1: Das Philadelphia Chromosom^[68]

Daraus resultieren Bcr-Abl Proteine mit den Größen 190, 210 und 230 kDa. Die verschiedenen Proteine sind für die Ausbildung der unterschiedlichen Leukämie-Phenotypen wie CML, ALL oder AML verantwortlich. Das Protein p210^{Bcr-Abl} wird hierbei in über 99% der Patienten bei der CML exprimiert. Bcr-Abl ist in der Lage, eine Vielzahl von Substraten an der Aminosäure Tyrosin zu phosphorylieren. Die strukturellen Motive des Bcr-Proteins umfassen einen N-Terminus und eine coiled-coil Struktur, welche an der Dimer Bildung beteiligt ist. Bemerkenswert ist die Fähigkeit zur Autophosphorylierung des Tyrosin-Rests (Tyr¹⁷⁷) im Bcr, wodurch eine SH2 Bindungsstelle für viele Substrate generiert wird. Die SH2 Domäne bindet an das Protein Grb-2 und verbindet Bcr-Abl damit mit der RAS-RAF-MAPK Signalkaskade.

Zu den Substraten von Bcr-Abl zählen Adapter Moleküle (Crkl, Shc, p61dok), Cytoskelett Proteine (Talin, Paxillin) und weitere Moleküle (p120cbl, PI3kinase, STAT-5), die direkt oder indirekt an der Zell-Signaltransduktionskaskade beteiligt sind. Die Aktivierung dieser Faktoren führt letztendlich zu einem starken Zellwachstum und der Inhibierung der Apoptose.^{[65], [66], [67]}

Bcr-Abl als Initiator der CML ist daher ein wichtiges Target bei der Entwicklung von Therapeutika. (Abb. 4.2)

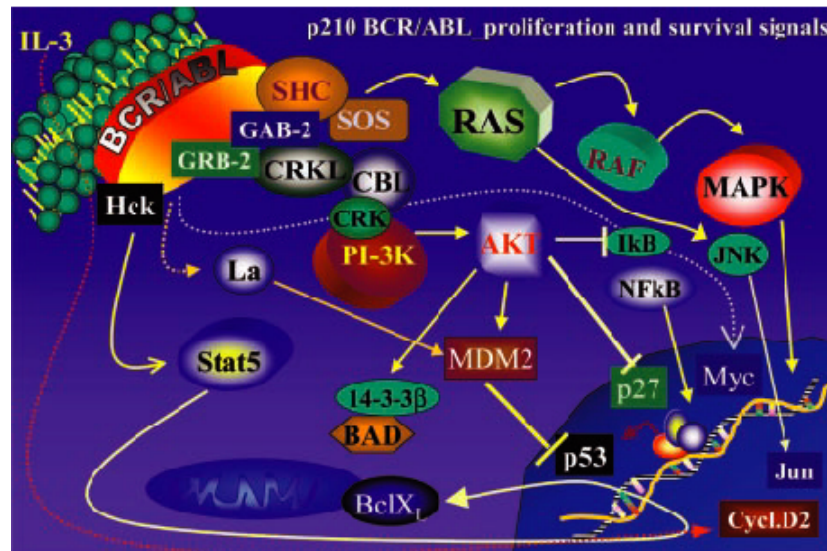


Abb. 4.2: Signalkaskade des Bcr-Abl-Proteins^[66]

4.3 Wirkstoffe zur Therapie der CML

Zum bekanntesten Wirkstoff der letzten Jahre zählt das Medikament Glivec® (STI571, Imatinibmesylat).^[68] Der 2-Phenylaminopyrimidin Tyrosin-Kinase-Inhibitor bindet an die Aminosäuren der Bcr-Abl ATP-Bindungsstelle und stabilisiert die inaktive, nicht ATP-bindende Form von Bcr-Abl. Hierdurch wird die Autophosphorylierung des Tyrosins verhindert und somit auch die Phosphorylierung der Substrate. Auf diese Weise wird die Signalkaskade unterbrochen, durch die letztlich die CML ausgelöst wird.

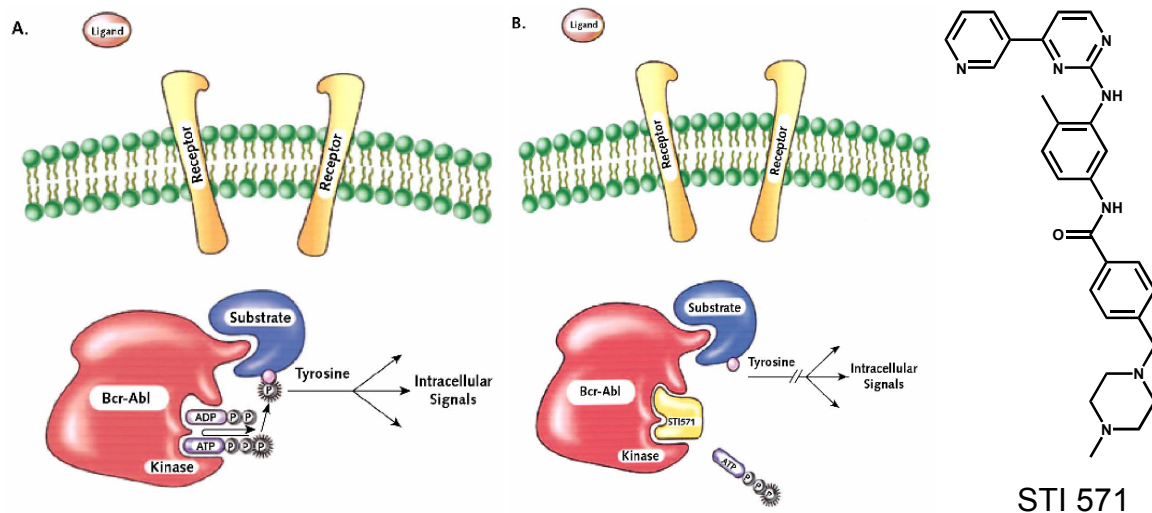


Abb. 4.3: Wirkmechanismus des STI571^[64]

Nach einer erfolgreichen Startphase wurden inzwischen erste Resistenzen (Bcr-Abl abhängige und unabhängige) bei der Applikation von Glivec beobachtet. Mechanismen hierfür sind in der Überexpression des Bcr-Abl-Proteins, Reduzierung der zellulären Aufnahme und spezifischen Mutationen innerhalb der ATP-Bindungsstelle zu suchen, die zu einer verminderten Bindung von STI 571 führen. Um den beobachteten Resistenz entgegenzuwirken, werden inzwischen andere antileukämische Medikamente in Kombination mit Glivec zur Therapie eingesetzt.^[69] Zur Zeit werden viele weitere Ansätze zur Bekämpfung der CML verfolgt.^[65] So können Protein Tyrosin Phosphatasen durch die Dephosphorylierung von Abl als Inhibitor des Bcr-Abl wirken. Um die Effektivität natürlicher Phosphatasen zu verbessern, wurde von Lim et al. ein Fusionsprotein synthetisiert.^[70] Neben diesem Ansatz sind auch Antisense Strategien in den Mittelpunkt gerückt. Als Angriffsort dient hierbei die mRNA Bcr-Abl. Spezifische Nucleinsäurekomplexe führen zur Bildung von RNA/DNA Duplexen, die zum einen eine Decodierung zum entsprechenden Protein blockieren und gleichzeitig die Spaltung durch RNase H auslösen. Desweiteren wurden auch Ribozyme gegen Bcr-Abl eingesetzt. Von ihnen verspricht man sich eine höhere Spezifität.

4.3.1 Analogie der Resistenzen von CML und HIV

Hinsichtlich der Resistenzen gegenüber Glivec lässt sich bei der Entwicklung neuer Therapie-Konzepte eine Analogie zur Therapie der HIV-Infektion mit Reverse Transkriptase (RT) Inhibitoren schließen. Die Monotherapie von HIV mit RT-Inhibitoren zeigt bei den meisten Patienten zunächst einen anti-viralen Effekt. Jedoch kommt es in fast allen Fällen zu einem Rückfall mit resistenter Infektion, die ebenfalls durch Mutationen hervorgerufen wird. Wie bereits im Kapitel 2 beschrieben, wurde bei gleichzeitigem Einsatz von RT- und Protease-Inhibitoren eine Verbesserung bei der Therapie erzielt. Wie HIV, ist auch CML einer hohen Mutation der genetischen Information unterworfen. Als Folge ergibt sich eine Resistenz gegenüber Glivec. Analog bietet sich daher ein Therapie-Ansatz an, indem gleichzeitig auch weiterführende Stationen der Signal-Transduktions-Kaskade gehemmt werden. Dazu ist es erforderlich, alle Signalwege, die für die Ausbildung der CML verantwortlich sind, zu identifizieren. Die Hemmung der *mRNA* des Bcr-Abl-Proteins wäre ein Beitrag zu diesem Problem, wobei der Eingriff schon vor dem Durchlaufen der Signaltransduktions-Kaskade erfolgt. Durch Wechselwirkung mit spezifischen Liganden könnte so die Entstehung des onkogenen Proteins unterdrückt werden (Abb. 4.4).

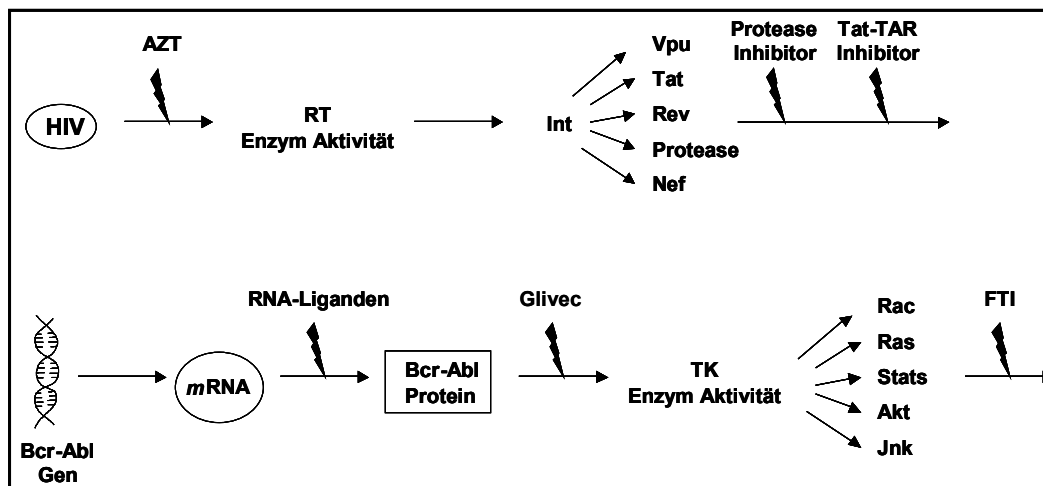


Abb. 4.4: Vergleich von Bcr-Abl und HIV

5 Synthese nicht-natürlicher Aminosäuren

Durch das Screening von Peptidbibliotheken lassen sich die Chancen zur Auffindung potentieller RNA-Liganden um ein Vielfaches erhöhen. Beim Design geeigneter RNA-Liganden sind verschiedene Faktoren zu berücksichtigen. Neben der Fähigkeit, über Wasserstoffbrücken-Bindungen mit der RNA zu interagieren, spielen auch Coulomb-Kräfte eine wesentliche Rolle. Die Wechselwirkung zwischen den positiven Seitengruppen von Aminosäuren mit dem negativ geladenen Phosphodiester-Rückgrat der RNA ist im allgemeinen jedoch nicht besonders selektiv. Neben diesen Wechselwirkungen sind auch stacking-Interaktionen ein wesentlicher Bestandteil bei der molekularen Erkennung von Nucleinsäuren.^[71] Es sind jedoch nur wenige natürliche Aminosäuren mit aromatischen und heteroaromatischen Seitenketten bekannt. Um die Anzahl aromatischer Aminosäuren zu erweitern, wurde im Rahmen dieser Arbeit der Zugang zu neuen nicht-natürlichen Aminosäuren über eine stereoselektive Totalsynthese etabliert.

5.1 Methoden zur enantioselektiven Synthese von Aminosäuren

Es gibt eine Reihe von Publikationen zur stereoselektiven Synthese von Aminosäuren. Die wichtigsten synthetischen Zugänge werden in den folgenden Kapiteln kurz dargestellt.

5.1.1 Synthese von α -Aminosäuren nach Schöllkopf

Zu den bekanntesten Methoden asymmetrischer Aminosäuresynthesen gehört die Schöllkopf-Synthese.^[72] Bei dieser Variante dient L-Valin als chirales Auxiliar, welches im weiteren Verlauf die Alkylierung von Glycin steuert (Abb. 5.1).

Nach Überführung des L-Valins (**20**) in das Säurechlorid, wird dieses nach Umsetzung mit dem Glycinethylester durch Erhitzen in das Diketopiperazid (**22**) übergeführt. Die Zugabe von Meerweinsalz generiert das CH-acide Bislactim (**23**). Die Deprotonierung mit LDA leitet den Alkylierungsschritt ein. Die sterische Abschirmung der Oberseite des Bislactims (**23**) durch die Seitenkette des Valins (**20**) ermöglicht eine Alkylierung mit hoher Diastereoselektivität.

Nach Spaltung unter sauren Bedingungen wird neben der alkylierten D-Aminosäure (**25**) das chirale Auxiliar L-Valin wieder regeneriert. Die Verwendung von D-Valin führt analog zur Synthese von L-Aminosäuren. Die Stereoselektivität wird sowohl

durch den Substituenten des Valins (**20**), als auch durch den sterischen Anspruch des Elektrophils, sowie durch die Wahl des Gegenions bestimmt.

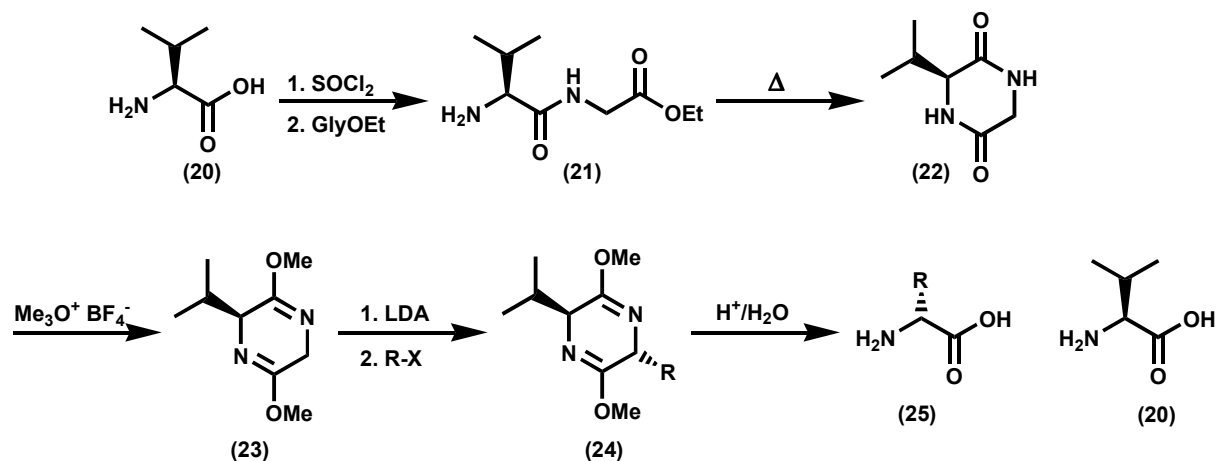


Abb. 5.1: Aminosäure-Synthese nach Schöllkopf

5.1.2 Synthese von α -Aminosäuren nach Evans

D. A. Evans verwendete für die stereoselektive Synthese von Aminosäuren Oxazolidinon-Derivate als Auxiliar.^[73] Diese sind sehr leicht aus den 1,2 Aminoalkoholen, wie z. B. Phenylalaninol oder Valinol zugänglich und werden durch Diethoxycarbonat in das Oxazolidinon-Derivat übergeführt (Abb. 5.2). Nach Deprotonierung lässt sich die Verbindung sehr leicht zum acetylierten Derivat (**26**) umsetzen und etabliert damit die Seitenkette der Aminosäure. Zur Einführung der Aminofunktion sind verschiedene Methoden bekannt. Die nachfolgende Aminierung wird dabei in jedem Fall durch den Substituenten des Oxazolidinons gesteuert. Der Eintritt des Elektrophils erfolgt daher von der sterisch weniger anspruchsvollen Seite. Auf diese Weise ist es möglich, sowohl D- als auch L-Aminosäuren enantiomerenrein zu synthetisieren. So führt die Umsetzung des Derivates (**27**) mit NBS in Gegenwart von $n\text{-Bu}_2\text{BOTf}$ zunächst zum α -Brom substituierten Derivat (**28**). Die $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion mit einem Azid führt unter Inversion des Stereozentrums zum α -Azidocarboximid (**29**). Anschließende Verseifung und Hydrogenolyse generieren (D)- α -Aminosäuren (**31**) in hohen Enantiomerenüberschüssen.

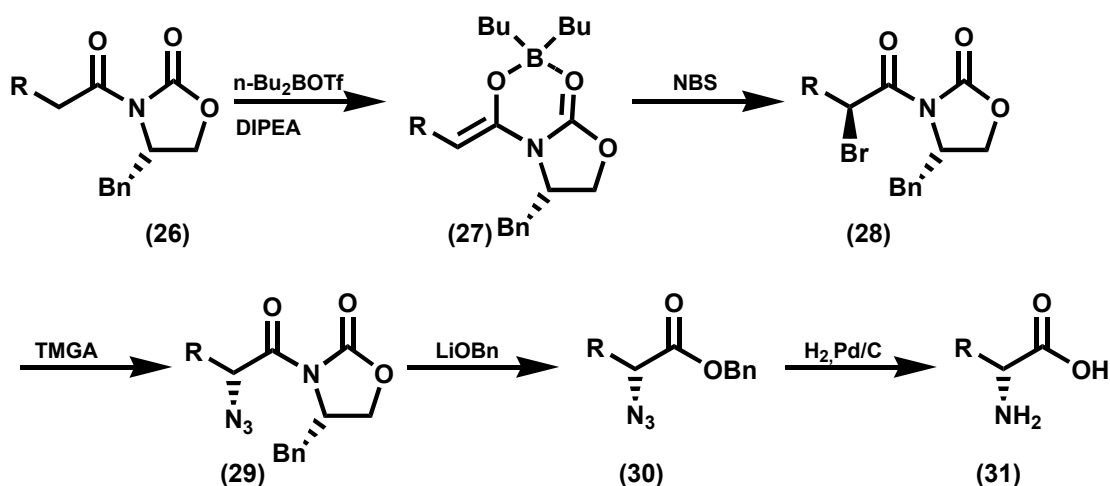


Abb. 5.2: Synthese nach Evans

Durch direkte Einführung der Aminofunktion lässt sich mithilfe des Auxiliars die (L)- α -Aminosäure herstellen (Abb. 5.3). Dabei entsteht durch Reaktion des Carboximids (32) mit Di-*tert*-butylazodicarboxylat (DBAD) das Boc-geschützte Derivat (33), welches nach Spaltung der Schutzgruppen, anschließender Hydrogenolyse und Amidspaltung zur L- α -Aminosäure (36) führt.

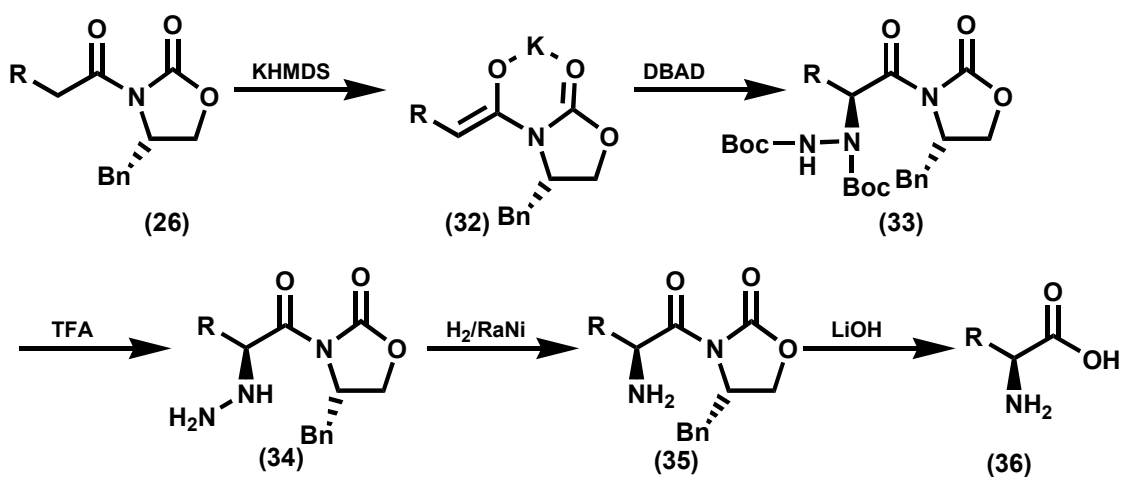


Abb. 5.3: Zugang zu D-Aminosäuren nach Evans

5.1.3 Synthese von α -Aminosäuren nach Oppolzer

Zur stereoselektiven Darstellung von α -Aminosäuren wurden von Oppolzer et al. Campher-Derivate eingesetzt (vgl. Abb. 5.4).^[74] Nach Enolisierung des Derivates (37) mit LDA in Gegenwart von TiCl_4 erfolgt die Umsetzung mit DBAD. Der Verlauf der

diastereoselektiven Reaktion wird durch die Chelatisierung des Auxiliars und des Enolats über die Titanspezies gesteuert. Nach Spaltung der Schutzgruppen mit TFA und Hydrogenolyse wird zunächst das Derivat **(39)** zugänglich. Durch saure Hydrolyse wird die freie α -Aminosäure **(40)** generiert.

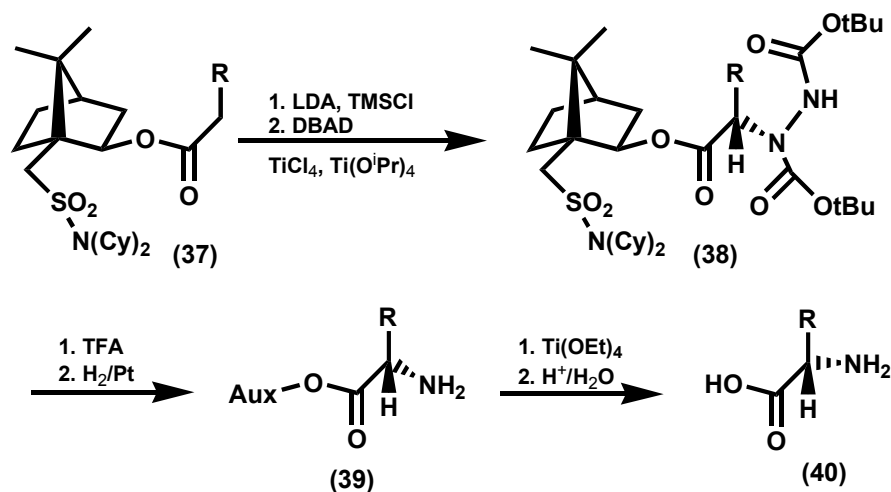


Abb. 5.4: Synthese nach Oppolzer

Bei einer Variation dieser Methode wird die Verwendung des Auxiliars Bornan-10,2-sultam beschrieben.^[75] Das Benzylhydryl-geschützte Derivat **(41)** wird in das Enolat **(42)** übergeführt und das entstandende (E)-Enolat mit einem Alkylhalogenid umgesetzt (vgl. Abb. 5.5). Nach vollständiger Entschützung der Aminofunktion und Abspaltung des Auxiliars ist die entsprechende α -Aminosäure **(44)** zugänglich.

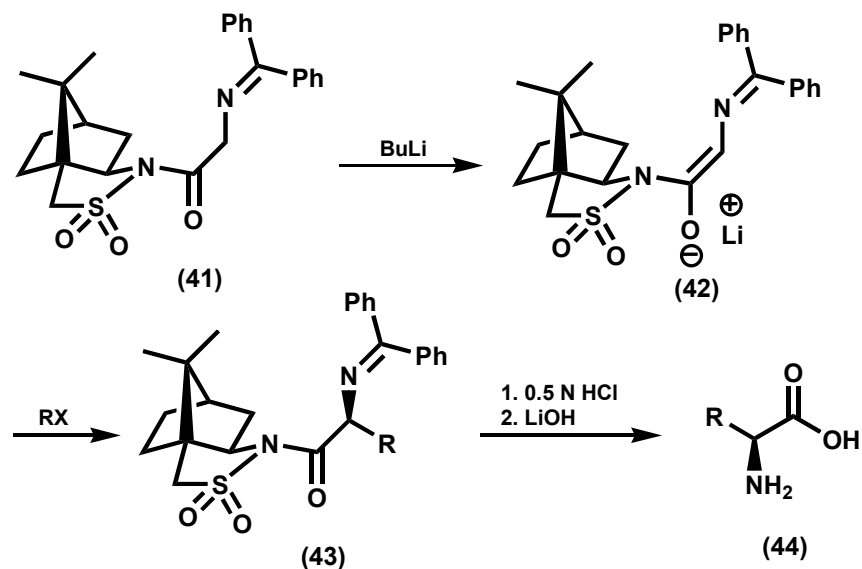


Abb. 5.5: Synthese nach Oppolzer über Benzylhydryl-Derivate

5.1.4 Synthese von α -Aminosäuren durch Phasen-Transfer-Katalysatoren

Bei dieser Methode erfolgt die asymmetrische Alkylierung eines prochiralen Glycin-Derivates in Gegenwart eines Phasen-Transfer-Katalysators (PTC). Die erste Alkylierung dieser Art wurde von O'Donnell an einem Glycin-Derivat mithilfe des PTCs N-(Benzyl)-Cinchonidium-Chlorid durchgeführt.^[76] Die Enantiomerenüberschüsse waren jedoch mit 66 % noch recht bescheiden. Von Corey et al. wurden Anthracenyl-substituierte Chincona-Alkaloide (PTC **46**) eingesetzt, die eine selektive Alkylierung des Glycin-Derivates (**45**) mit 94 % ee bewirkten (vgl. Abb. 5.6).^[77] Es gibt eine Vielzahl verschiedenster Chincona-Alkaloide, die inzwischen auch Festphasen-gebunden eingesetzt werden. An dieser Stelle sei auf die Literatur hingewiesen.^{[78],[79]}

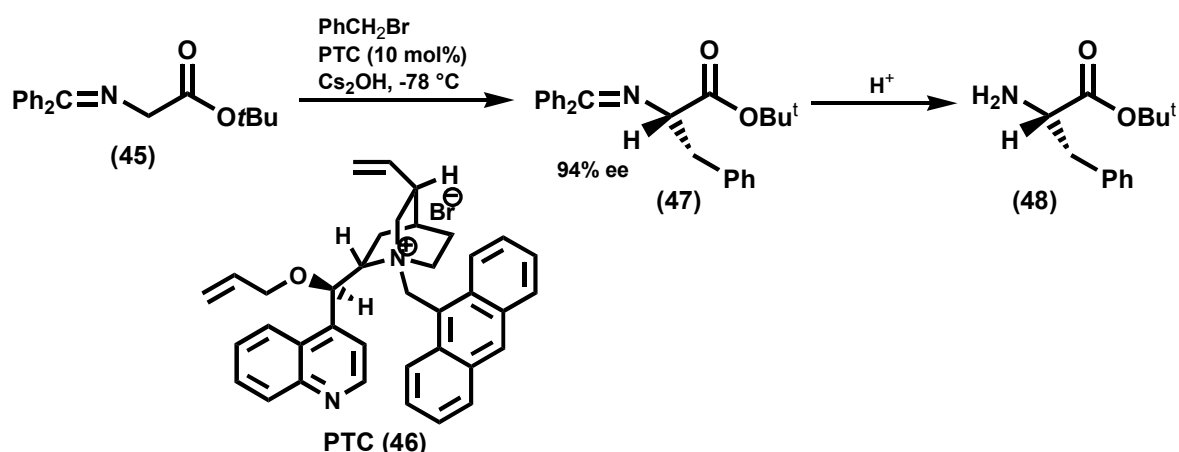


Abb. 5.6: Synthese von Aminosäuren in Gegenwart von Phasen-Transfer-Katalysatoren

5.1.5 Synthese von α -Aminosäuren nach der Strecker-Methode

Bereits 1850 wurde von Strecker die erste Synthese von α -Aminosäuren vorgestellt.^[80] Durch Kondensation eines Aldehyds mit Ammoniak und HCN wird nach Hydrolyse die α -Aminosäure generiert. Durch den Zusatz von chiralen Katalysatoren ist es inzwischen möglich, eine stereoselektive Strecker-Reaktion durchzuführen und dabei optisch aktive Aminosäuren zu synthetisieren. Bei dieser asymmetrischen Synthese werden zumeist Imine eingesetzt, welche anschließend durch Addition von HCN oder TMSCN in Gegenwart eines chiralen Katalysators zu α -Aminosäuren mit hohen Enantiomeren-Überschüssen führen. Mittlerweile gibt es eine Vielzahl geeigneter katalytischer Systeme, die sowohl Organo- als auch Metall-

Katalysatoren umfassen. An dieser Stelle sollen nur einige Beispiele dargestellt werden und zugleich auf die erschienenen Review-Artikel verwiesen werden.^[81] Von Shibasaki et al. wurde ein Aluminium(III)-Binaphthol-Katalysator (**50**) mit Lewis-Base und Säure-Aktivität vorgestellt (Abb. 5.7). Ausgehend vom Imin (**49**) erfolgte in Gegenwart dieses Katalysators (**50**), TMSCN und Benzol die Generierung des α -Aminonitrils (**51**) mit einer Enantioselektivität von 95 %. Während das Imin am Lewis-sauren Aluminium-Zentrum koordiniert, erfolgt gleichzeitig eine Wechselwirkung zwischen der Trimethylsilyl-Gruppe und dem Phosphinoxid-Substituenten. Durch diese Interaktion wird die Stereoselektivität der Strecker-Reaktion gesteuert. Das Aminonitril wurde anschließend in mehreren Stufen in das Aminoamid (**52**) übergeführt.

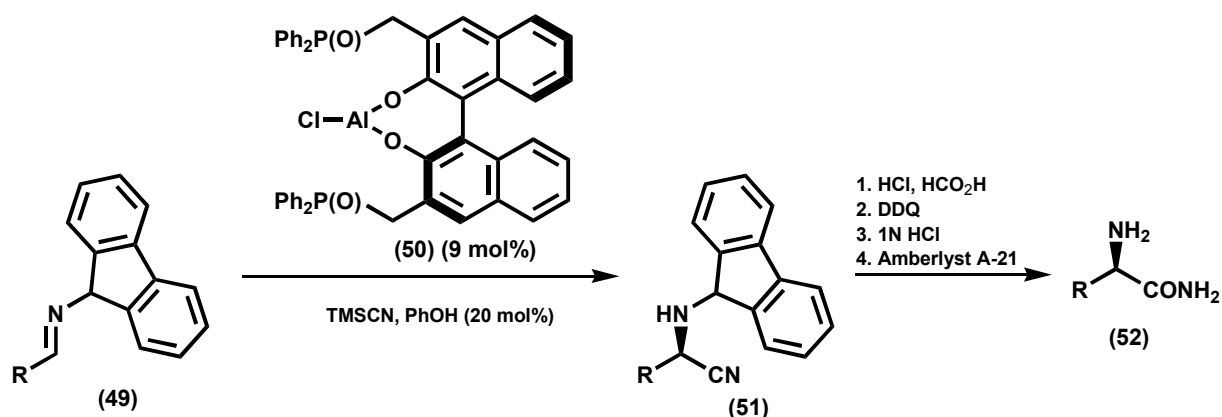
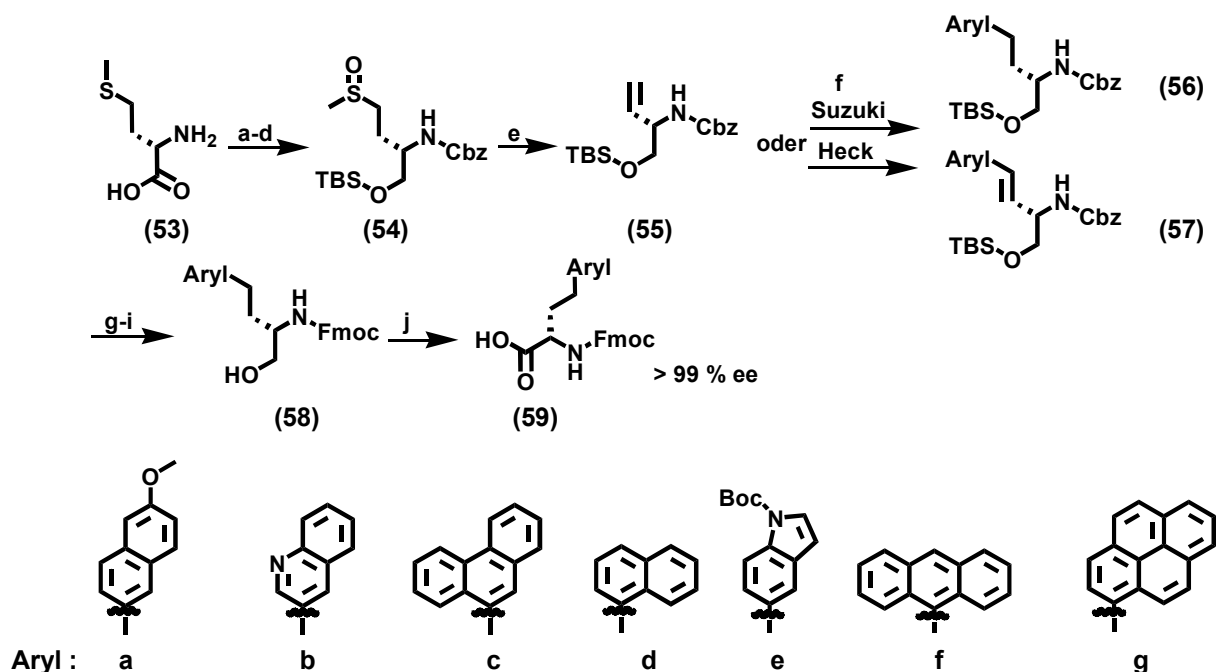


Abb. 5.7: Synthese nach der Strecker-Methode

5.1.6 Chiral-Pool Synthese von α -Aminosäuren

Ausgehend von Methionin (**53**) wurde im Arbeitskreis Prof. Göbel eine chiral-pool-Synthese zur Herstellung von α -Aminosäuren mit C2-Seitenkette etabliert (vgl. Abb. 5.8).^{[82],[83]} Reduktion der Säurefunktion, Schützung der Aminogruppe und des Alkohols führten nach der Oxidation mit NaIO₄ zum Sulfoxid (**54**). Durch Pyrolyse erhielt man das Vinylglycin (**55**). Zwei Ansätze führten hierbei über Palladium-katalysierte Kreuzkupplungen in mehreren Schritten zur α -Aminosäure. Über eine Suzuki-Kupplung mit vorangegangener *in situ* Hydroborierung konnten verschiedene Aromaten an der Seitenkette etabliert werden. Entschützungen der Amino- und Alkoholfunktion, Fmoc-Schützung des N-Terminus und abschließende Oxidation führten zur α -Aminosäure mit aromatischer C2-Seitenkette.

Im zweiten Ansatz wurde die Heck-Kupplung zur Einführung der aromatischen Seitenkette benutzt.^[84]



a) LiAlH_4 , THF, 76 % (b) Cbz-Cl (c) TBS-Cl, Imidazol (d) NaIO_4 , 94 % (3 Stufen) (e) o-Dichlorbenzol, 180 °C, 88 % (f) Suzuki: 1. 9-BBN 2. Aryl-Br, CsF, $\text{Pd}[\text{dppf}]\text{Cl}_2$, 83-97 % für Substrate a-f / Heck: $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, K_2CO_3 , $n\text{Bu}_4\text{NOTf}$, Aryl-Br, 75-89 % für Substrate a und g (g) TBAF, 68-84 % (h) 1,4-Cyclohexadien, $\text{Pd}(\text{OH})_2$ (i) Fmoc-Suc, 57-84 % (2 Stufen) (j) PDC, DMF, 56-86 %.

Abb. 5.8: Chiral Pool Synthese von Aminosäuren

Von Taylor et al. wurde eine Synthese von α -Aminosäuren mit C3-Kette publiziert (vgl. Abb. 5.9).^{[85],[86],[87]} Eine Boc-Schützung und Veresterung von (L)-Allylglycin (**60**) führt über eine anschließende Hydroborierung-Suzuki-Kreuzkupplung zu Aminosäurederivaten mit C3-Seitenkette. Leider wurden hier außer der Bestimmung von Drehwerten keine weiteren Untersuchungen zur Ermittlung der Enantiomerenreinheit unternommen.

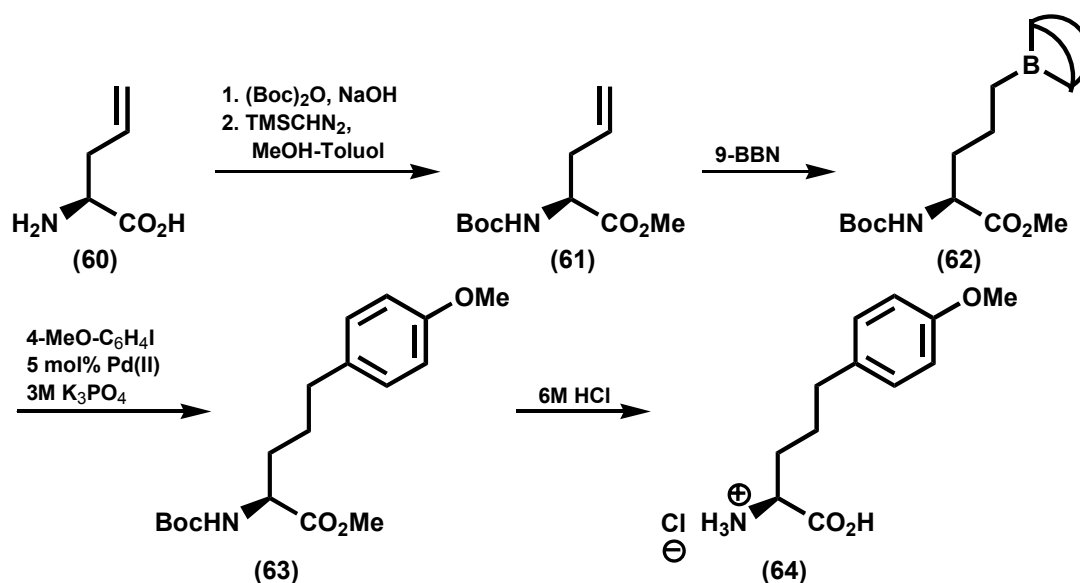


Abb. 5.9: Synthese von Aminosäuren über Suzuki-Kupplung

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde eine stereoselektive Variante zur Synthese von α -Aminosäuren mit C3-Seitenkette, die auf der Synthese von Myers et al. basiert, verwendet.^[88] Neben einer stereoselektiven Allylierung waren die Hydroborierung und die anschließende Suzuki-Kupplung ein Schlüsselschritt in der Synthese. Diese Kupplungsreaktion wurde erstmals 1986 von Suzuki und Miyaura et al. veröffentlicht. Diese Methode bietet den Vorteil eines vielseitigen und schonenden Verfahrens und erlaubt sogar die Präsenz von Wasser. Die Abfolge von oxidativer Addition, Transmetallierung und reduktiver Eliminierung kann von vielen Faktoren beeinflusst werden. Neben der Auswahl des Katalysators -häufig Pd(PPh₃)₄ oder [PdCl₂(dppf)]- sind auch die verwendete Base, das Lösungsmittel und das zu kuppelnde Arylhalogenid häufig variierte Parameter zur erfolgreichen Durchführung von Suzuki-Reaktionen. In der letzten Zeit gab es eine Reihe von neuen Entwicklungen, wie z. B. ligandenfreie oder mikrowellenkatalysierte Suzuki-Reaktionen. Es sei daher an dieser Stelle auf die Literatur verwiesen.^{[89],[90],[91],[92]}

6 Eigene Arbeiten

6.1 Stereoselektive Synthese von nicht-natürlichen Aminosäuren

Die bereits beschriebenen Synthesemethoden haben den Nachteil, daß die Seitenkette zumeist durch die Einführung an einem prochiralen Molekül etabliert wird. Diese Variante unterliegt jedoch der Gefahr einer möglichen Racemisierung, so daß jede neue Aminosäure auf ihre Enantiomerenreinheit untersucht werden mußte.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher ein zentraler chiraler Baustein mit Allylseitenkette aufgebaut werden. Eine Möglichkeit zur Etablierung neuer aromatischer Seitenketten stellen Suzuki-Kupplungen dar. Von entscheidender Bedeutung war jedoch, daß die nachfolgenden Reaktionsschritte einen racemisierungsfreien Verlauf garantieren.

Durch die stereoselektive Synthese nach Myers eröffnete sich eine weitere Zugangsmöglichkeit zu nicht-natürlichen Aminosäuren. In dem totalsynthetischen Ansatz dient das chirale Reagenz Pseudoephedrin als wertvolles Auxiliar für die stereoselektive Alkylierung eines Glycinderivates (Abb. 6.1).^{[93],[94],[95],[88]}

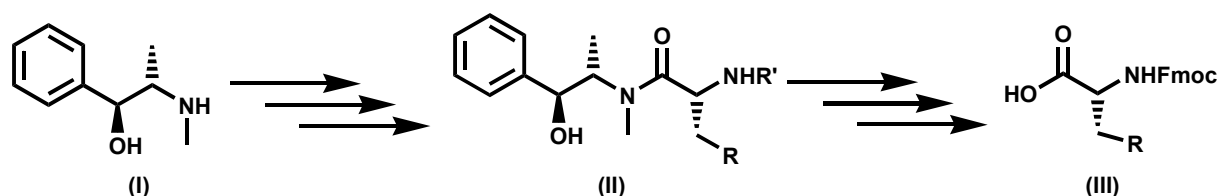
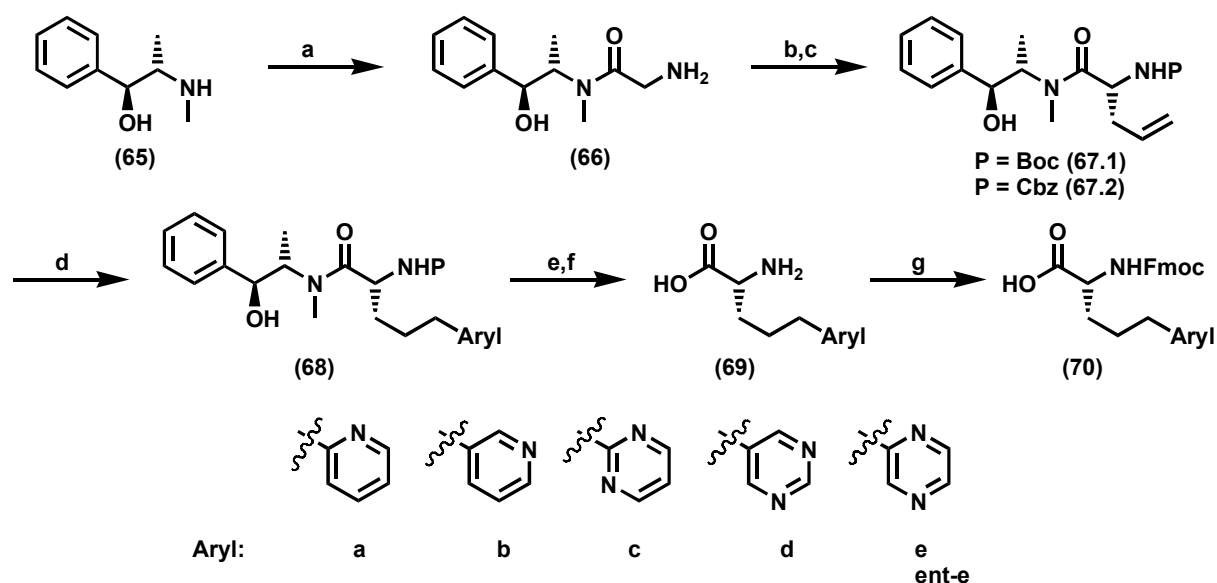


Abb. 6.1: Synthese von Aminosäuren

Der Vorteil dieser Methode ist, daß je nach Wahl der Konfiguration (*S,S* oder *R,R*) des Pseudoephedrins sowohl D- als auch L-Aminosäuren zugänglich sind. Auf diese Weise wurden von Myers eine Reihe von Aminosäuren synthetisiert, wobei jede neue Aminosäure auf ihre Enantiomerenreinheit geprüft werden mußte. Das Allylglycin-Derivat (**67**) stellt einen sehr nützlichen zentralen Baustein für die Synthese von chiralen Aminosäuren dar. In einer vorangegangenen Diplomarbeit konnte eine *in situ* Hydroborierung mit anschließender Suzuki-Kupplung erfolgreich durchgeführt und damit die Anwendbarkeit dieser Methode demonstriert werden.^[96]



(a) LiOtBu, THF, Glycinmethylester HCl, 68 % (b) LiN(TMS)₂, LiCl, THF, Allylbromid, 0 °C, 65 % (c) für (67.2) CHCl₃, Et₃N, Cbz-Cl, 87 % (d) 9-BBN, THF dann K₃PO₄, Aryl-X, Pd(PPh₃)₄, 5 mol %, 27-90 % (e) MeOH, H₂, Pd/C (f) H₂O, Rückfluß, 60 % (2 Stufen) (g) TMS-Cl, DCM, DIPEA, Fmoc-Cl, 70 %

Abb. 6.2: Syntheseverlauf zur Generierung von Aminosäuren mit C2-Seitenkette

Ausgehend von (S,S)-Pseudoephedrin (**65**) erfolgte zunächst in Gegenwart von Lithium-*tert*-butoxid die Umsetzung mit Glycinmethylester-Hydrochlorid zum Pseudoephedringlycinamid (**66**) (vgl. Abb. 6.2). Das entstandene Pseudoephedrin-Derivat (**66**) ließ sich sehr leicht als Hydrat in einer Ausbeute von 68 % kristallisieren. Das Pseudoephedrin-glycinamid-Hydrat wurde anschließend einer Alkylierung unterzogen. Nach der verbesserten Methode von Myers mußte das Hydrat für diese Reaktion nicht mehr aufwendig dehydratisiert werden. Versuche zur Alkylierung Cbz-geschützter Glycinamide hatten gezeigt, daß diese unter den gegebenen Bedingungen zur Zersetzung neigen.^[95] Die Verwendung von Lithiumhexamethyldisilazid als Ersatz für Lithiumdiisopropylamid erleichterte die Synthese hierbei erheblich, da bei der Reaktion keine Nebenprodukte mehr entstanden. Eine Schützung der Aminofunktion war an dieser Stelle der Synthese nicht erforderlich. Für die Enolisierung des Glycinamid Hydrats mußten jedoch durch die Gegenwart der Alkoholfunktionalität unter optimierten Bedingungen schließlich 3.2 eq LiHMDS eingesetzt werden. Für eine erfolgreiche Alkylierung ist es von entscheidender Bedeutung, gewisse Parameter einzuhalten. So werden zunächst 3 eq LiCl in THF vorgelegt und gerührt, bis eine gute Durchmischung gegeben ist. Anschließend erfolgt die portionsweise

Zugabe des Glycinamid-Hydrats. Eine einheitliche Verteilung des LiCl ist hierbei essentiell, da das Gemisch ansonsten präzipitiert. Bei gleichmäßiger Konzentration bildet sich jedoch aus der Suspension eine klare homogene Lösung. Interessanterweise sind weder LiCl noch das Hydrat allein in THF löslich. In diesem Fall dient das LiCl als ein Lösungsvermittler. Bei der anschließenden Deprotonierung sollte die optimale Zugabe der 3.2 eq in zwei Schritten erfolgen. Zunächst werden 1.5 eq des LiHMDS unter Temperaturkontrolle langsam hinzugetropft. Die restlichen 1.7 eq müssen jedoch schnellstmöglich auf einmal hinzugesetzt werden. Ansonsten droht wiederum die Präzipitation der Reaktionskomponenten.

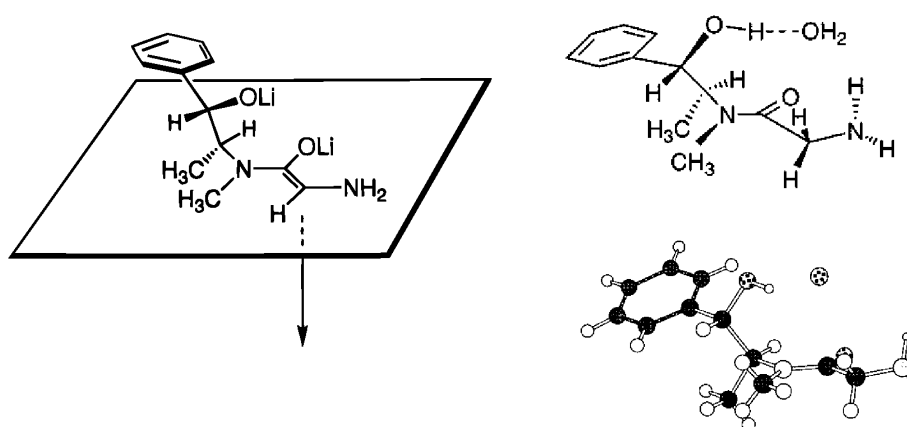


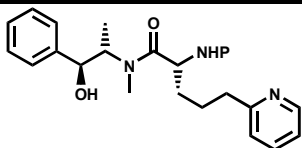
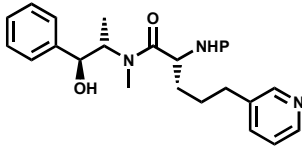
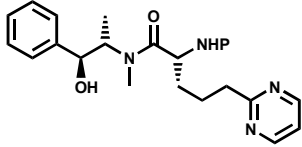
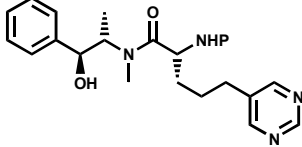
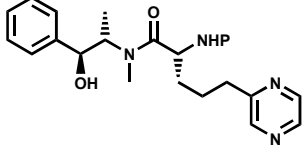
Abb. 6.3: Modell zur stereoselektiven Alkylierung^[88]

Für die hohe Diastereoselektivität der Reaktion wird folgendes Modell angenommen: Die si-Enolat-Seite wird durch das sekundäre Lithium Alkoxid abgeschirmt. Zusätzlich sind in diesem Bereich weitere THF-Moleküle assoziiert. Die Pseudoephedrin-Seitenkette nimmt eine gestaffelte Konformation ein. Der Vergleich mit der Struktur des Hydrats ist besonders interessant, da eine Ähnlichkeit zu der angenommenen Struktur des Enolats besteht. Durch diese Konformation des Enolats ist ein Angriff von der re-Seite des Moleküls sterisch bevorzugt (Abb. 6.3). Die Umkristallisation des Alkylierungsprodukt aus THF bewirkt eine weitere Erhöhung des Enantiomerenüberschusses.

In den ersten Versuchen zur Kreuzkupplung wurde das Boc-geschütztes Derivat eingesetzt. Dieses konnte durch Schützung mit Boc-Anhydrid im Ultraschallbad unter Zusatz von NaHCO_3 mit einer Ausbeute von 85 % hergestellt werden. Zur Suzuki-Kupplung wurde die Allylseitenkette zunächst *in situ* hydroboriert. Wegen der freien

Hydroxylfunktion waren hierfür mindestens 2 eq. 9-BBN (0.5 M in THF) erforderlich, die optimalen Ausbeuten wurden jedoch mit 2.4 eq erzielt. Die Hydroborierung verlief im allgemeinen sehr schnell (ca. 10 Minuten) und konnte durch DC-Kontrolle verfolgt werden. Die eigentliche Kupplung erfolgte in Gegenwart von 5 mol% $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, 3 eq wässriger K_2CO_3 (3 M) und 1.05 eq des jeweiligen Heteroarylhalogenids. Bei der Kupplung wurden 2- und 3-Brompyridin, 2- und 5-Brompyrimidin und Chlorpyrazin verwendet. Bei drei Halogeniden erfolgte die Umsetzung in recht guten Ausbeuten (2-pyridinyl-, 2-pyrimidinyl-, pyrazinyl-Derivat). Das 3-Pyridyl-substituierte Derivat hingegen konnte nur mit Ausbeuten um 20 % isoliert werden, wohingegen sich das 5-Brompyrimidin unter diesen Bedingungen nicht kuppeln ließ. Die Aufreinigung der Produkte erwies sich als schwierig und erforderte eine HPLC-Trennung. Die Ausbeuten der Kupplungen sind in Tabelle 6.1 dargestellt.

Tab. 6.1: Ausbeuten bei der Suzuki-Kupplung mit den Derivaten (67.1) und (67.2); Reaktionsbedingungen: 2.4 eq 9-BBN (0.5 M in THF), Raumtemperatur, 5 mol% $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, 3 eq K_2CO_3 , 1.05 eq RX

Arylhalogenid	Verbindung	Ausbeute Boc	Ausbeute Cbz
2-Br-Pyridin		76 %	90 %
3-Br-Pyridin		20 %	38 %
2-Br-Pyrimidin		68 %	88 %
5-Br-Pyrimidin		0 %	27 %
Cl-Pyrazin		75 %	86 %

Trotz Variation der Reaktionsbedingungen blieb das Derivat des 5-Pyrimidinyls unzugänglich. Eine Erhöhung der Reaktionstemperatur unter den oben beschriebenen wäßrigen Bedingungen führte vielmehr zu einer Vielzahl von nicht definierten Produkten, was u. a. auf die Abspaltung des Auxiliars zurückzuführen ist. Der Austausch der Base bzw. des Palladiumkatalysators blieb ebenfalls erfolglos. Die untersuchten Bedingungen sind in Tabelle 6.2 dargestellt.

Tab. 6.2: Suzuki-Kupplung des Derivates (**67.1**) mit 5-Brompyrimidin

Arylhalogenid ^[a]	Katalysator	Base	Ausbeute
5-Br-Pyrimidin	Pd(PPh ₃) ₄ , 5 mol% ^[a]	NaOH (10%), 3 eq	-
	Pd(PPh ₃) ₄ , 5 mol% ^[a]	Ag ₂ O, 2 eq	-
	Pd(OAc) ₂ , 10 mol% ^[a]	Na ₂ CO ₃ , 2 eq	-
	Pd(polymerbound) ^[a]	K ₃ PO ₄ ^[b]	-
	Pd(PPh ₃) ₄ , 5 mol% ^[c]	CsF, (3 eq)	-
	Pd[(dppf)Cl ₂], 5 mol% ^[a]	K ₂ CO ₃ , (3 eq)	-

[a] Kupplungsreaktionen: 2.4 eq 9-BBN (0.5 M in THF), 1.05 eq RX, Raumtemperatur
 [b] 2-Propanol/H₂O 1:1^[97] [c] 9-BBN (Feststoff), 1.5 eq

Bessere Ausbeuten konnten bei den Kreuzkupplungsreaktionen mit der Cbz-geschützten Verbindung (**67.2**) erhalten werden. In Gegenwart von Et₃N und Cbz-Cl erfolgte die Schützung der Aminofunktion mit einer Ausbeute von 87 %. Die Suzuki-Kupplung war bei allen oben genannten Arylhalogeniden unter den bekannten Bedingungen erfolgreich. Bemerkenswert ist, daß sich das Chlor-Pyrazin bei Raumtemperatur mit Ausbeuten von 86 % kuppeln ließ, obwohl aus der Literatur bekannt ist, daß sich Chloroaromaten im allgemeinen sehr schlecht kreuzkuppeln lassen, bzw. zumindest sehr hohe Reaktionstemperaturen erfordern.^[89] Auch die Synthese des 5-Pyrimidinyl-Derivates war unter diesen Bedingungen möglich. Weiterhin konnte auch die Aufreinigung der Rohprodukte vereinfacht werden. Die aufwendige HPLC-Trennung wurde durch säulenchromatische Aufreinigung ersetzt. Um eine weitere Steigerung der Ausbeute zu erzielen, wurden die Kupplungen nochmals in Gegenwart des Katalysators Pd[(dppf)Cl₂] durchgeführt. Es konnte jedoch keine höhere Ausbeute erzielt werden, vielmehr erforderten diese Reaktionsbedingungen wieder eine HPLC-Trennung der Rohprodukte. Versuche, die Ausbeute

über eine Temperaturerhöhung zu steigern, zeigten ebenfalls keinen Erfolg und führten zu Produktgemischen, die keine weitere Isolierung ermöglichten.

Nach Entschützung der Aminofunktion durch Hydrierung (H_2 , Pd/C) wurde das Auxiliar Pseudoephedrin wieder abgespalten. Um das Risiko einer möglichen basenkatalysierten Racemisierung gänzlich auszuschließen, wurde das Derivat in Wasser ohne Basenzusatz refluxiert. Dadurch konnte außerdem eine Kontamination des Produkts mit Salzen verhindert werden. Da die Aminosäuren später im Rahmen einer kombinatorischen Bibliothek nach der Fmoc-Strategie integriert werden sollten, folgte abschließend die N-terminale Schützung mit Fmoc-Cl. Zur Verbesserung der Löslichkeit der Aminosäure im organischen Lösungsmittel wurde zunächst eine *in situ* TMS-Schützung der Säurefunktion durchgeführt. Anschließende Fmoc-Schützung in Gegenwart von DIPEA und nachfolgende TMS-Abspaltung bei der Aufarbeitung generierten die D-konfigurierten Fmoc-geschützten Aminosäuren (**70**). In Abb. 6.2 ist das vollständige Syntheschema aufgeführt. Um die Enantiomerenreinheit der Aminosäuren zu überprüfen, erfolgte analog die Synthese des L-Pyrazinyl (**ent-70e**) Derivates durch Verwendung des Auxiliars (*R,R*)-Pseudoephedrin. Der Enantiomerenüberschuß der D- und L-Aminosäure wurde mittels chiraler HPLC bestimmt. So konnte das D-Pyrazinyl-Derivat mit einem ee von 99 % erhalten werden, das L-konfigurierte Derivat war mit einem Überschuß von mehr als 99 % zugänglich. Dieses Ergebnis unterstreicht, daß es sich bei dieser Synthese um eine racemisierungsfreie Methode handelt.^[83] Ein Überblick der synthetisierten Aminosäuren ist in Abb. 6.4 dargestellt.

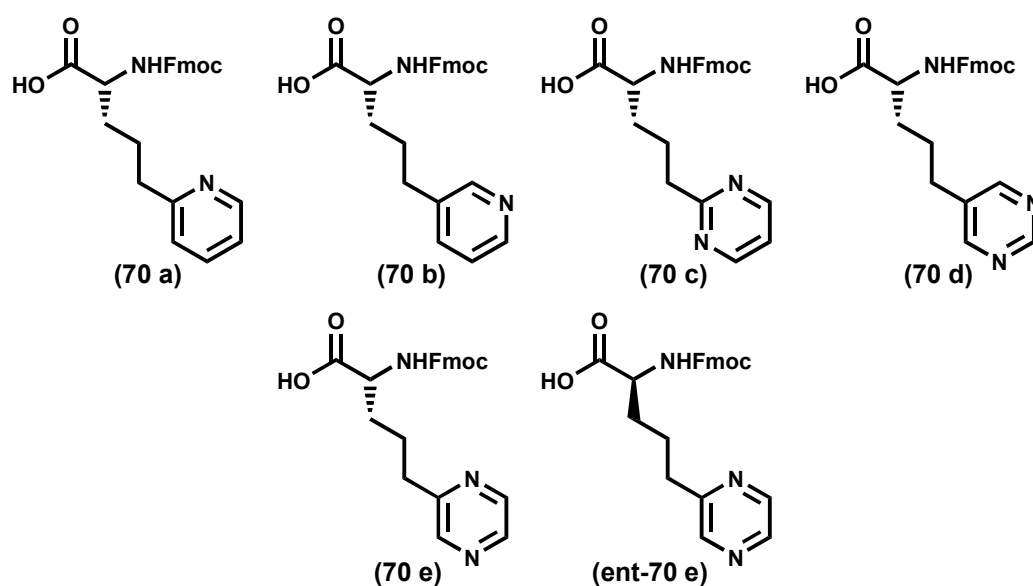
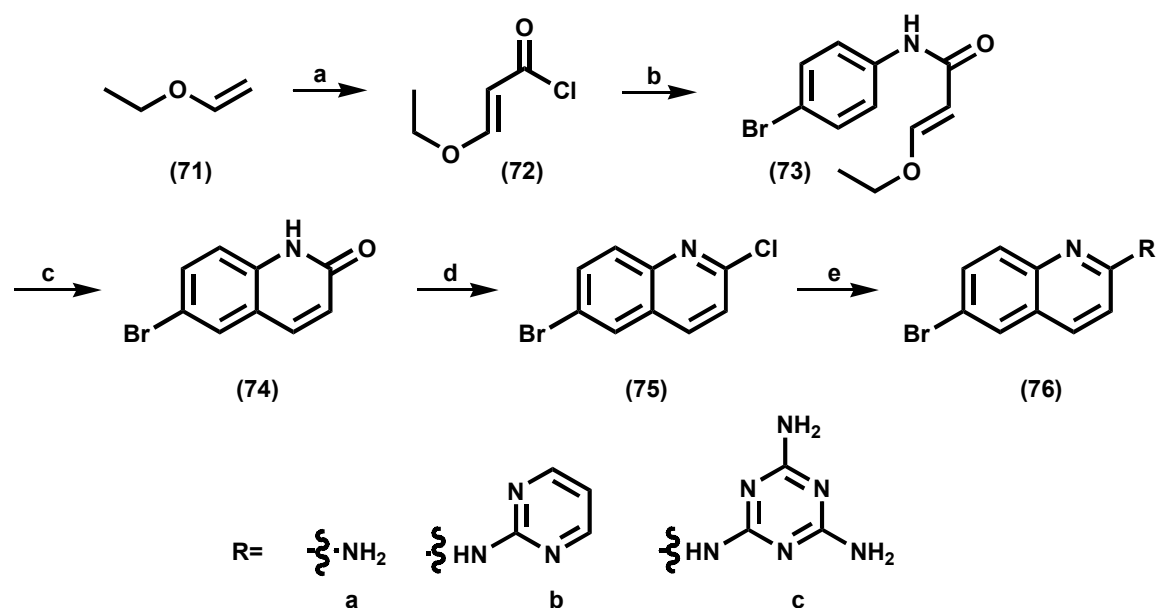


Abb. 6.4: Synthetisierte Aminosäuren

Parallel zur Synthese dieser Aminosäuren wurde das Kupplungsverhalten weiterer aromatischer Substrate unter Suzuki-Bedingungen untersucht. So wurden folgende Aromaten zunächst eingesetzt: 5-Brom-2-Boc-aminopyridin, 7-Bromo-1-hydroxyisoquinolin und 5-Bromuracil. Letztere ließen sich unter den gewählten Bedingungen (s.o.) nicht an das Glycin-Derivat (**67**) kuppeln. Auch die Variation des Lösungsmittels führte hierbei nicht zum Erfolg. Hauptursache hierfür ist sehr wahrscheinlich das schlechte Löslichkeitsverhalten des Bromuracils. Die Überführung in das entsprechende TMS-geschützte Derivat des Brom-Uracils führt zwar zum gelösten Intermediat, unter Kupplungsbedingungen fiel das Edukt jedoch wiederum nach wenigen Minuten aus der Reaktionslösung aus. Eine Umsetzung erfolgte nicht. Die Kupplung des 2-Boc-5-Brom-aminopyridins führte mit mäßigen Ausbeuten zum gewünschten Produkt. Die Cbz-Entschützung der Aminofunktion verlief wie gewohnt. Die Abspaltung des Auxiliars in refluxierendem Wasser hatte in diesem Fall jedoch gleichzeitig den Verlust der Boc-Schutzgruppe zur Folge. Da eine Differenzierung beider Aminofunktionen nicht mehr gegeben war, konnte die Verbindung nicht in der geplanten Fmoc-Festphasensynthese eingesetzt werden. Auch die Verwendung anderer Schutzgruppen (Mtr) führte nicht zum gewünschten Erfolg. In einem weiteren Ansatz wurde die Herstellung eines Brom-Lactams (**74**) und dessen Derivate untersucht (Abb. 6.5), welche ebenfalls nach der Kupplung unter Suzuki-Bedingungen neue Aminosäuren generieren sollten.^[98] Nach Umsetzung des Ethoxyvinylethers (**71**) mit Oxalylchlorid wurde das entstandene Säurechlorid mit p-Bromanilin in das Amid (**73**) überführt. Der Ringschluß zum entsprechenden Lactam (**74**) wurde unter stark sauren Bedingungen durchgeführt (Abb. 6.5). Die Suzuki-Kupplung erfolgte zunächst unter Standardbedingungen. Hierbei war es jedoch nicht möglich, das Brom-Lactam (**74**) an das Allylglycin-Derivat zu kuppeln. Es wurden daraufhin verschiedenste Reaktionsparameter variiert. Eine Zusammenstellung ist in Tabelle 6.3 wiedergegeben.



a) Oxalylchlorid, 0 °C \rightarrow RT, 67 % b) *p*-Bromanilin, CH₂Cl₂, Pyridin, RT, 60% c) H₂SO₄, 0 °C \rightarrow RT, 80 % d) POCl₃, 90 °C, 100% e) für 76a Acetamid, 200°C, 82 %

Abb. 6.5: Synthese der Derivate (74), (75) und (76)

Tab. 6.3: Suzuki-Bedingungen zur Kupplung des Bromlactams (74)

Katalysator	Lösungsmittel	Temperatur	Base
Pd(PPh ₃) ₄	THF	RT	K ₃ PO ₄ (Lösung)
Pd(PPh ₃) ₄	DMF, Bu ₄ NCl	RT	K ₃ PO ₄ (Lösung)
Pd(OAc) ₂	THF	RT	K ₃ PO ₄ (Lösung)
Pd(OAc) ₂	Dioxan	RT	K ₃ PO ₄ (Lösung)
Pd(OAc) ₂	Dioxan	70 °C	K ₃ PO ₄ (Feststoff)
Pd(OAc) ₂	Dioxan	70 °C	CsCO ₃ (Feststoff)
Pd(PPh ₃) ₄	THF	70 °C	K ₃ PO ₄ (Feststoff)
Pd(PPh ₃) ₄	DMF/THF	RT	K ₃ PO ₄ (Lösung)
Pd(PPh ₃) ₄	DMF ^[a]	80 °C	K ₃ PO ₄ (Feststoff)
Pd(PPh ₃) ₄	DMF ^[a]	80 °C	Cs ₂ CO ₃ (Feststoff)
Pd(OAc) ₂	DMF ^[a]	80 °C	K ₂ CO ₃ (Feststoff)
Pd(OAc) ₂	DMF ^[a]	80 °C	Cs ₂ CO ₃ (Feststoff)
Pd(OAc) ₂ , PCy ₂ (biphen)	DMF ^[a]	RT \rightarrow 80 °C	Cs ₂ CO ₃ (Feststoff)
Pd(PPh ₃) ₄ ^[b]	THF	RT \rightarrow 80 °C	K ₃ PO ₄ (Feststoff)
Pd(PPh ₃) ₄ ^[b]	DMF ^[a]	RT \rightarrow 80 °C	K ₃ PO ₄ (Feststoff)
Pd(PPh ₃) ₄ ^[b]	THF	RT \rightarrow 80 °C	Cs ₂ CO ₃ (Feststoff)
Pd(OAc) ₂ ^[b]	THF	RT \rightarrow 80 °C	K ₃ PO ₄ (Feststoff)

^[a]Hydroborierung mit 9 BBN in THF, Entfernung des THF im Vakuum und Zugabe von DMF und allen anderen Komponenten. ^[b]vor der Zugabe des Lactams wurde dieses TMS-geschützt und anschließend als Lösung zur Reaktion gegeben.

Da die Hydroborierung mit 9-BBN in THF sehr schnell und zuverlässig verlief, wurde diese Methode beibehalten. Das THF wurde hierfür im Vakuum entfernt und es erfolgte die Zugabe von DMF und aller anderer Reaktionspartner. Hierbei war bei erhöhten Temperaturen zu berücksichtigen, daß die entsprechende Base nur in Form von Feststoff eingesetzt werden durfte. Die Gegenwart wäßriger Lösungen bei erhöhter Temperatur hatte bereits zuvor sehr schnell zum Verlust des chiralen Auxiliars geführt. Das Hauptproblem lag, wie bereits beim Bromuracil beschrieben, in der schlechten Löslichkeit des Brom-Lactams. So fiel das zuvor gelöste Edukt sehr häufig während der Reaktion aus und entzog sich somit der Suzuki-Kupplung. Deshalb wurde das Bromlactam in das entsprechende TMS-geschützte Derivat überführt. Doch auch bei dieser Variante zeigte sich keine Umsetzung mit dem Allylderivat (**67.2**).

Zur Herstellung weiterer Derivate erfolgte die Überführung des Bromlactams (**74**) in das 5-Brom-2-chlorchinolin (**75**). Durch Umsetzung mit Acetamid bei hohen Temperaturen konnte das Amidin-Derivat (**76a**) hergestellt werden.^[99] Auch mit dieser Verbindung konnte unter den beschriebenen Suzuki-Bedingungen kein Umsatz erzielt werden.

Die Umsetzung des Chlorchinolins (**75**) mit 2-Aminopyrimidin bzw. Melamin führte zu den zersetzungsanfälligen Verbindungen (**76b**) und (**76c**). Sie wurden deshalb *in situ* in die Suzuki-Kupplung eingesetzt, wobei eine Vielzahl von Produkten entstand. Bedingt durch die Instabilität ließen sich die Kupplungsprodukte nur massenspektrometrisch nachweisen. Wegen der schlechten Ausbeuten bzw. des komplizierten Reaktionsverhaltens wurde die Synthese dieser Aminosäuren auf diesem Weg nicht weiterverfolgt.

6.2 Einsatz der nicht-natürlichen Aminosäuren in der Festphasen-Tripeptid-Synthese

Um den generellen Nutzen der neuen Aminosäuren für die Fmoc-Festphasen-Peptid-Synthese zu demonstrieren, wurden diese in Tripeptide des Musters Arg-X-Arg eingebaut.^[100] Als feste Phase wurde das Rink-Amid-Harz (**77**) eingesetzt (Abb. 6.6), und die Kupplung der Aminosäuren erfolgte nach der Fmoc-Strategie. Nach Abspaltung vom polymeren Träger werden auf diese Weise Tripeptide mit Amid-Terminus generiert. Beim häufig verwendeten Wang-Harz (**78**) wird hingegen nach Abspaltung des Peptids vom Harz die freie Säure zugänglich. Das Rink-Amid-Harz (**77**) erfordert im Gegensatz zum Wang-Harz (**78**) bei der Kupplung jedoch keine hochaktivierten Aminosäuren. Die Gefahr der Racemisierung ist daher sehr gering.

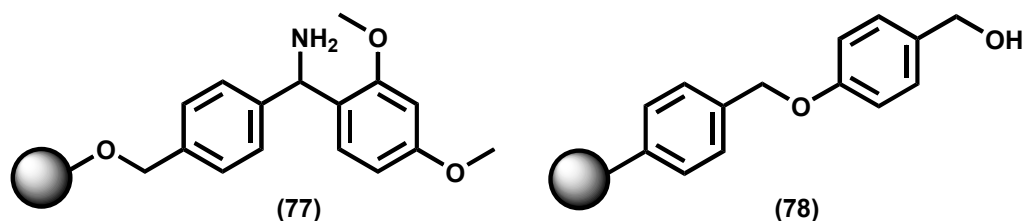


Abb. 6.6: Strukturen des Rink-Amid- und Wang Harzes

Beim Rink-Amid Harz wird das entsprechende Tripeptid abschließend unter sauren Bedingungen als Amid abgespalten. Das bei der Abspaltung aus dem Rink-Amid-Harz gebildete Kation erfährt unter diesen Bedingungen durch die vorhandenen Methoxy-Funktionen eine mesomere Stabilisierung. (Siehe Abb. 6.7)

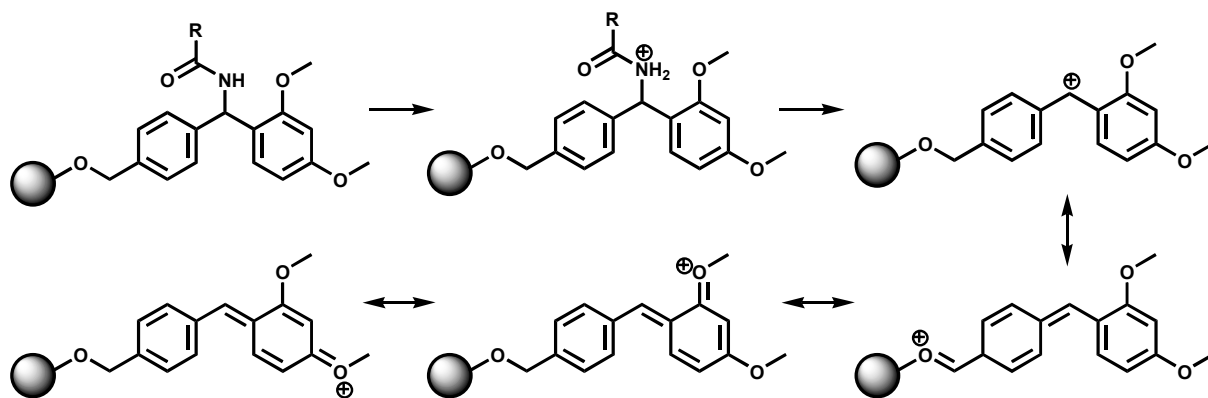


Abb. 6.7: Mechanismus zur Rink-Amid-Abspaltung

Zur Aktivierung der Aminosäuren wurden HOBT und DIC in DMF eingesetzt. Bei dieser Reaktion bildet sich zunächst das Acylisoharnstoff-Derivat (**81**). Hierbei handelt es sich um einen Aktivester, der zum O-N-Acyltransfer (**82**) neigt. Der dabei entstehende N-Acylharnstoff entzieht sich somit der eigentlichen Kupplung (Abb. 6.8). Durch die Zugabe von HOBT wird dieser Reaktionsschritt unterbunden. Neben HOBT gibt es eine Vielzahl weiterer Aktivierungsreagenzien wie PyBOB oder HBTU.

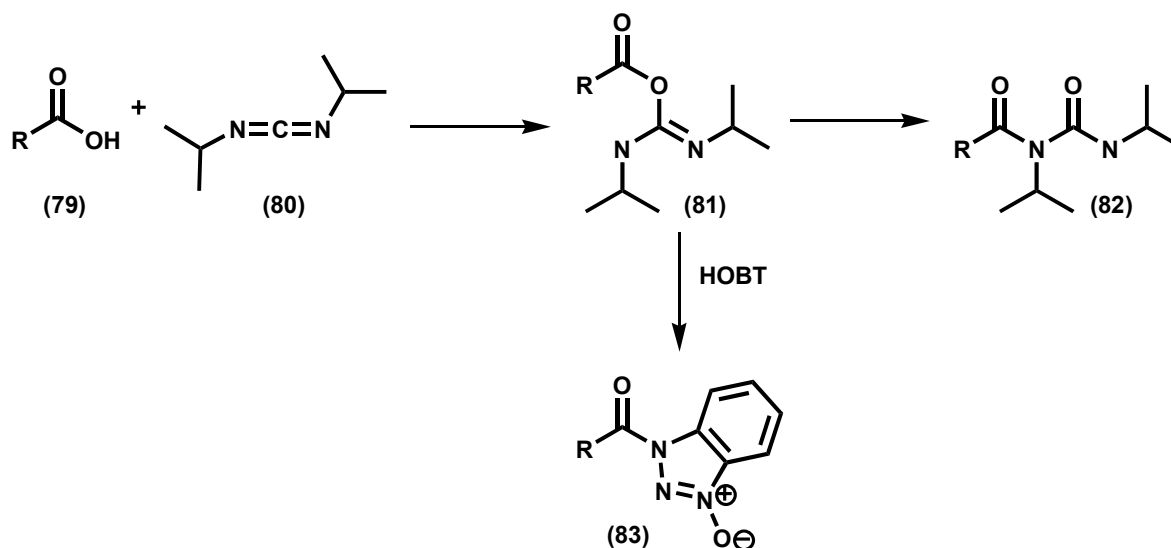


Abb. 6.8: Aktivierung von Aminosäuren

Für die Synthese der Tripeptide Arg-X-Arg war es von besonderem Interesse, daß die Reaktionen ohne Nebenreaktionen verlaufen. Nur so konnte ein erfolgreicher Einsatz in kombinatorischen Bibliotheken gewährleistet sein. Die Entschützung von Arginin ist ein sehr kritischer Schritt. So kommt es bei der sauren Abspaltung von Sulfonsäure-Schutzgruppen wie Mtr oder Pmc zur Bildung von elektrophilen Intermediaten, die zu Nebenprodukten führen können. Für Aminosäuren, die diese drastischen Bedingungen überstehen, sollte der Einsatz in anderen Aminosäure-Sequenzen daher unproblematisch sein. Auf diese Weise konnten 5 Tripeptide des Musters D-Arg-X-D-Arg hergestellt werden. Da die Tripeptide im weiteren Verlauf auch in einem Zellassay untersucht werden sollten, wurde zur Erhöhung der Peptid-Stabilität gegenüber Proteasen D-Arginin eingesetzt. Die D-konfigurierten Aminosäuren bieten allgemein den Vorteil, daß sie von Proteasen schlechter identifiziert werden können.^[101] Der Abbau der Tripeptide innerhalb der Zelle sollte dadurch verzögert werden und eine längere Stabilität für Langzeitexperimente ermöglichen.

Die Synthese des Tripeptids D-Arg-D-5pyrim-D-Arg war jedoch nicht erfolgreich und führte zu massenspektroskopisch erkennbaren Nebenprodukten. Es wurden verschiedene Abspaltbedingungen gewählt, die aber nicht zum Erfolg führten. Die Bedingungen sind in der nachfolgenden Tabelle 6.4 aufgeführt. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde vom Einsatz dieser Aminosäure in peptidischen Bibliotheken abgesehen.

Tab. 6.4: Variierte Abspaltbedingungen

Eintrag	Abspaltbedingungen	Zeit	Ergebnis ^[a]
1	TFA/PhSH/PhOH/H ₂ O/EDT 82.5 : 5 : 5 : 5 : 2.5	5 h	M+138
2	TFA/TIS/H ₂ O 92 : 5 : 5 : 2.5	4.5 h	M+/M+138 1 : 1
3	TFA/TIS/H ₂ O 60 : 39 : 1	4.5 h	M+/M+138 1:1
4	TFA/PhSH/PhOH/H ₂ O/EDT/TIS 81.5 : 5 : 5 : 5 : 2.5 : 1	4.5 h	M+/M+138 2 : 1
5	TFA/PhSH/PhOH/H ₂ O/TIS 84 : 5 : 5 : 5 : 1	4.5 h	M+/M+138 1 : 2
6	TFA/TES/H ₂ O 92.5 : 5 : 2.5	4.5 h	M+/M+138 1 : 1
7	TMSBr/EDT/PhOH/H ₂ O 84 : 1 : 5 : 10	15 min	0
8	CH ₂ Cl ₂ /TFA 70 : 30	30 min	M+/M+61 4 : 5

[a] Ergebnis aus der massenspektroskopischen Untersuchung mit M⁺ = 507.4; M+x stellt eine entsprechend höhere Masse dar

Eine Übersicht der synthetisierten nicht-natürlichen Peptide ist in Abb. 6.9 dargestellt. Um einen Vergleich zu Tripeptiden aus Standard-Aminosäuren zu ziehen, wurden eine Reihe weiterer Peptide aus D-Aminosäuren mit dem bevorzugten Muster D-Arg-X-D-Arg hergestellt. Die hergestellten Tripeptide sind in der Tabelle 6.5 dargestellt.

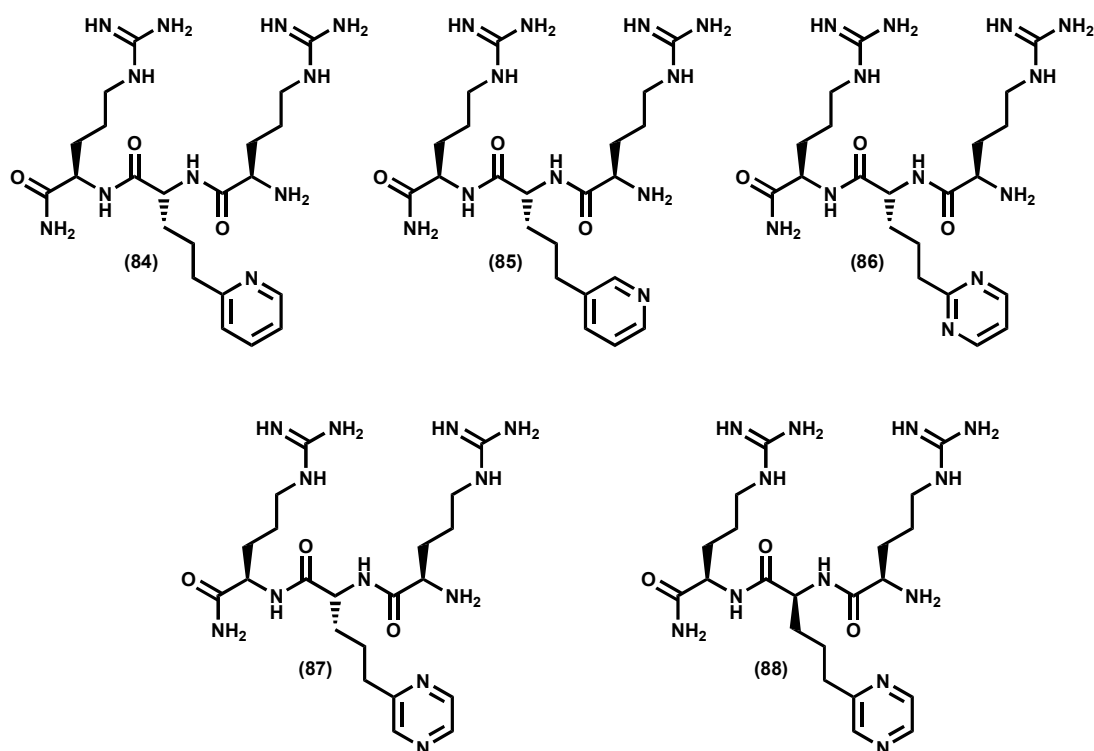


Abb. 6.9: Hergestellte Tripeptide des Musters D-Arg-X-D-Arg

Tab. 6.5: Synthetisierte Tripeptide

Synthetisierte Tripeptide aus	
nicht-natürlichen Aminosäuren	Standard-Aminosäuren
(84) $\text{CONH}_2\text{-D-Arg-D-2pyr-D-ArgNH}_2$	(90) $\text{CONH}_2\text{-D-Arg-D-Arg-D-ArgNH}_2$
(85) $\text{CONH}_2\text{-D-Arg-D-3pyr-D-ArgNH}_2$	(91) $\text{CONH}_2\text{-L-Arg-L-Arg-L-ArgNH}_2$
(86) $\text{CONH}_2\text{-D-Arg-D-2pyrim-D-Arg NH}_2$	(92) $\text{CONH}_2\text{-D-Arg-D-Phe-D-ArgNH}_2$
(87) $\text{CONH}_2\text{-D-Arg-D-pyra-D-ArgNH}_2$	(93) $\text{CONH}_2\text{-L-His-L-His-L-HisNH}_2$
(88) $\text{CONH}_2\text{-D-Arg-L-pyra-D-ArgNH}_2$	(94) $\text{CONH}_2\text{-D-Arg-D-Trp-D-ArgNH}_2$
(89) $\text{CONH}_2\text{-D-Arg-D-Arg-D-2pyrimNH}_2$	(95) $\text{CONH}_2\text{-D-Arg-D-Tyr-D-ArgNH}_2$
	(96) $\text{CONH}_2\text{-D-Arg-D-Arg-D-TrpNH}_2$

Das Tripeptid $\text{CONH}_2\text{-D-Arg-D-Trp-D-ArgNH}_2$ ließ sich nicht immer ohne Nebenreaktionen synthetisieren. Von einem Einsatz der Aminosäure D-Trp in kombinatorischen Bibliotheken wurde daher abgesehen.

Um die biologische Aktivität der synthetischen Tripeptide hinsichtlich ihrer Affinität zur TAR-RNA (HIV-1) zu untersuchen, wurden diese in einem *in vitro* Assay untersucht. Zellkulturexperimente sollten weiteren Aufschluß über ihre *in vivo*

Aktivität geben. Es war hierbei auch von Interesse, ob es sich bei den identifizierten RNA-Liganden tatsächlich um tat-TAR-Inhibitoren handelt oder ob eine Inhibierung, wie häufig beschrieben auf Entry-Ebene erfolgt.^[36] Die folgenden Kapitel beschreiben die Ergebnisse aus den biologischen Untersuchungen.

7 In vitro Assay und Zellkulturexperimente

In einem *in vitro* Assay sollten die zuvor synthetisierten Tripeptide auf ihre Fähigkeit zur Inhibition der Tat-TAR Interaktion untersucht werden. Peptide, die in diesem Assay durch ihre Affinität zur TAR-RNA auffielen, wurden anschließend in einem *in vivo* Zellkulturassay näher auf ihre Wirkung hin untersucht.

Als *in vitro* Assay diente hierbei der von Matsumoto et al. beschriebene FRET-Assay in modifizierter Form (vgl. Abb. 7.1).^[102]

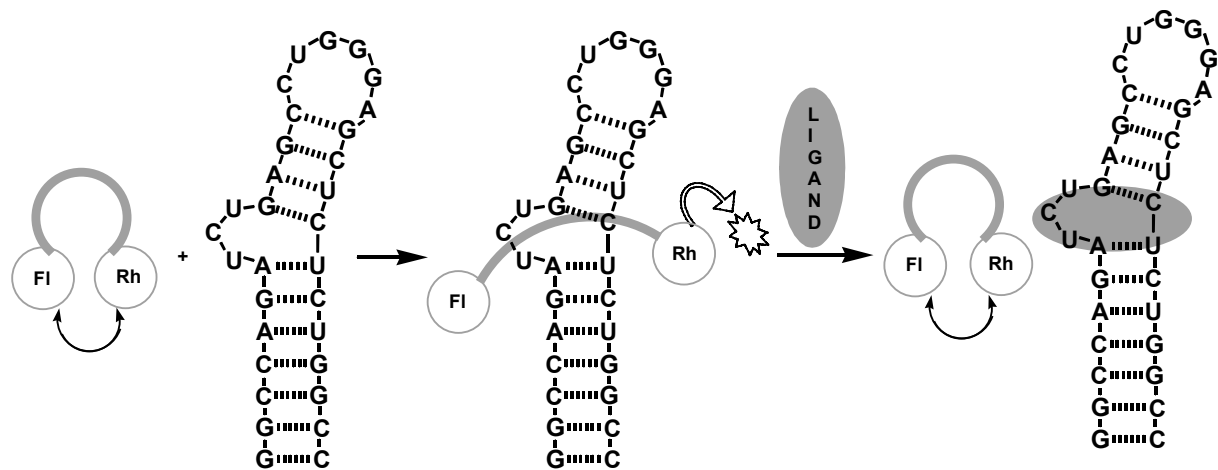


Abb. 7.1: FRET Assay

Im vorliegenden Assay wurde das Tat-Peptid (Tat₄₉₋₅₇-Sequenz: Fluorescein-AAARKKRRQRRRAAAC-Rhodamin) endständig mit Fluorescein und Rhodamin markiert. Während das Fluorescein über die Carboxy-Funktion an der festen Phase eingeführt werden kann, muß die N-terminale Modifikation über ein Maleinimid am Cystein-Rest gekuppelt werden. Um unerwünschte Interaktionen der Farbstoffe mit der TAR_{wt}-RNA zu verhindern, wurden beide Termini um drei Alanin-Reste verlängert. Die TAR_{wt}-RNA wurde ungelabelt eingesetzt. Die Farbstoffe Rhodamin (Rh) und Fluorescein (F) bilden ein ideales Paar für einen *Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer*. Im gebundenen Zustand nehmen die beiden Farbstoffe nach der Förster-Gleichung einen idealen Abstand voneinander ein und der maximale FRET-Effekt wird erreicht. Eine Anregung des Fluoresceins ($\uparrow 490$ nm, $\downarrow 520$ nm) führt zu einer Übertragung auf das Rhodamin ($\uparrow 540$ nm, $\downarrow 590$ nm), welches dann höchste Emission zeigt. Im ungebundenen Zustand hingegen liegt das Tat-Peptid als random-coil-Struktur vor, wobei eine Dimer-Bildung beider Farbstoffe zu einer Auslöschung des Signals führt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Assay leicht

modifiziert. Aus Geräte-typischen Gründen wurde bei einer Wellenlänge von 544 nm eingestrahlt. Durch die Dimerbildung der Farbstoffe im ungebundenen Zustand erfolgt ein Quenchen der Rhodamin Emission. Bei Bindung an die TAR_{wt}-RNA hingegen verstärkte sich die Emission des Rhodamins mit einem Maximum bei 590 nm. Durch diesen Effekt konnte der Assay unter Verwendung der zuvor angegebenen Wellenlängen durchgeführt werden und zeigte einen Fluoreszenz-Faktor (FF_{\max}) von 2.4 (100 nM Tat-Peptid gebunden/freie Form, im weiteren als KF bezeichnet). Die Zugabe von RNA-Liganden bewirkt eine Verdrängung des Tat-Peptids und somit eine Abnahme des Signals, die eine Ermittlung von IC_{50} -Werten ermöglicht. Ein kritischer Aspekt im Assay war die Konzentrationsbestimmung der TAR_{wt}-RNA. Nach der Transkription der RNA erfolgte eine Aufreinigung über eine NAP-Säule. Es zeigte sich jedoch, daß sich hierbei nicht alle NTP's entfernen ließen. Auch eine zweifache Reinigung über die NAP-Säule verbesserte den Reinheitsgrad nicht. Da der Anteil an NTP's und Abbruchsequenzen die UV-spektrometrische Konzentrations-Bestimmung der RNA erheblich verfälschte, mußte daher eine andere Aufreinigungsmethode gewählt werden. Die TAR_{wt}-RNA wurde daraufhin PAGE-gereinigt, wodurch eine Abtrennung der NTP's erzielt werden konnte. Im Assay wurde für die TAR_{wt}-RNA und das Tat-Peptid eine Konzentration von 100nM verwendet und der maximale Fluoreszenz-Faktor (FF_{\max}) bestimmt. Dieser Faktor wurde aus der Titration des Tat-Peptids mit der RNA bestimmt. Der FF_{\max} wurde hierbei durch den Maximalwert, der sich bei 1:1 Stöchiometrie von Tat zu TAR_{wt}-RNA ergibt, bestimmt. ($FF_{\max} = \text{Signal Tat-TAR} / \text{Signal Tat} = 2.6$). Hierfür wurden 100 nM Tat-Peptid mit einer PAGE gereinigten TAR_{wt}-RNA titriert (vgl. Abb. 7.2). Eine 1:1 Stöchiometrie von Tat-Peptid zur TAR-RNA ergab sich in unserem Fall ebenfalls um 100 nM. Dieses ermöglichte zum einen die Bestimmung von IC_{50} -Werten bis zu 50 nM. Anhand dieser Titration wurde die Bindungskonstante des markierten Tat-Peptids berechnet. Die Titrationskurve ist in Abbildung 7.2 dargestellt. Ein Schema zur Durchführung und Bestimmung von IC_{50} -Werten als auch der Titrationen verschiedener RNAs ist im experimentellen Teil explizit dargestellt.

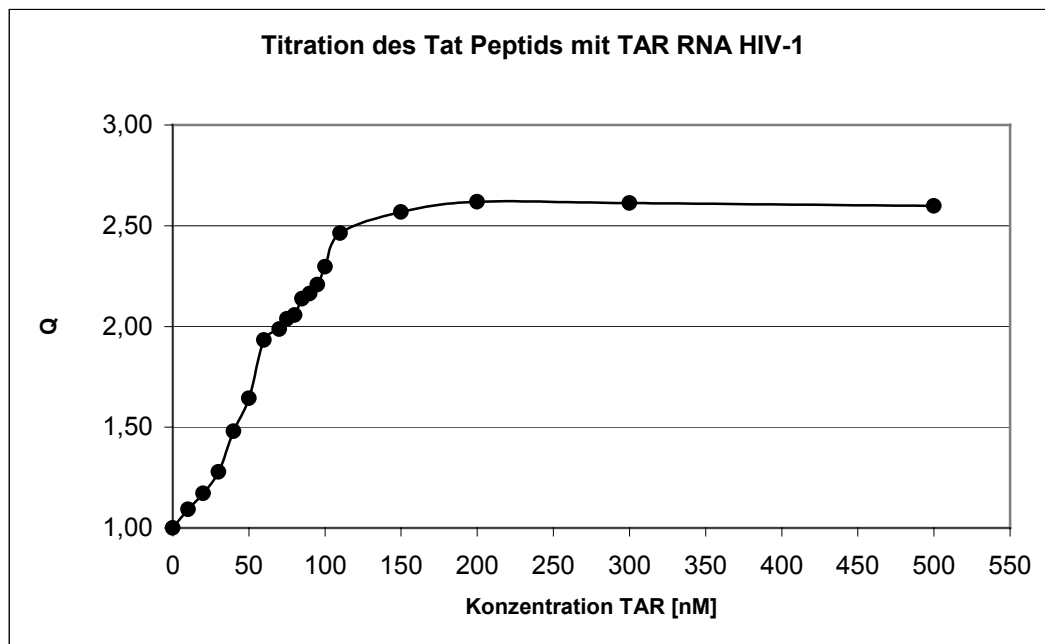


Abb. 7.2: Titration des Tat-Peptids mit HIV-1 TAR-RNA ($[Peptid]=100$ nM; 37°C , $\text{pH}7.4$)

Der Kurvenverlauf der Titration läßt im Bereich von 50 nM TAR-RNA eine 2:1 Stöchiometrie von Tat:TAR-RNA vermuten, die bei weiterer Zugabe von TAR-RNA in eine 1:1 Stöchiometrie übergeht. Aus der Berechnung der Bindungskonstanten für das Tat-Peptid (Gl. 2.4) erhielt man - unter Annahme einer 1:1 Stöchiometrie - einen K_D von 2 nM. Bei 100 nM ergab sich eine Komplexierung von 92%.

Desweiteren wurde die Titration bei geringerer Tat-Peptid-Konzentration (10 nM) durchgeführt. Die Fluoreszenzsignale wiesen hierbei jedoch erhebliche Schwankungen innerhalb einer Messung auf, wobei die schwache Intensität des Fluoreszenz-Signals einen maximalen Verstärkungsfaktor des Gerätes erforderte. Aufgrund der mangelnden Fluoreszenz-Empfindlichkeit bei niedrigeren Tat-Peptid-Konzentrationen wurde im Assay daher eine Peptid-Konzentration von 100 nM beibehalten.

Eine Zugabe von Inhibitoren bewirkt eine Verdrängung des Tat-Peptids und geht mit einer Abnahme des Signals einher. Die Titration des Tat-TAR Systems mit Inhibitoren liefert eine Kurve, aus der die IC_{50} -Werte bestimmt werden können. Ein Beispiel ist in folgender Abbildung (Abb. 7.3) dargestellt.

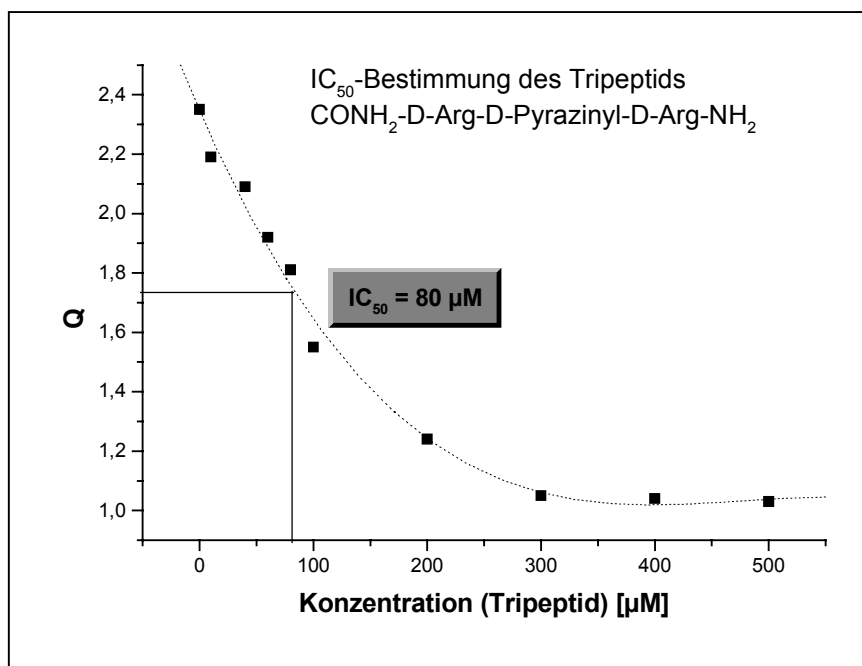


Abb. 7.3: Bestimmung des IC_{50} -Wertes ($[Tat];[TAR]=100$ nM; $37^{\circ}C$, pH 7.4)

Für die untersuchten Tripeptide konnten folgende IC_{50} -Werte bestimmt werden (Tab. 7.6):

Tab. 7.6: Synthetisierte Tripeptide ($CONH_2$ -X-X-X- NH_2)

Tripeptide	IC_{50}^*	Tripeptide	IC_{50}^*
D-Arg-D-Arg-D-Arg (90)	4	D-Arg-D-Trp-D-Arg (94)	2
L-Arg-L-Arg-L-Arg (91)	4	D-Arg-D-Tyr-D-Arg (95)	80
D-Arg-D-Phe-D-Arg (92)	75	D-Arg-D-Arg-D-Trp (96)	90
L-His-L-His-L-His (93)	4200	Argininamid (4)	1400
D-Arg-D-2pyrim-D-Arg (86)	2	D-Arg-D-2pyridyl-D-Arg (84)	80
D-Arg-D-Arg-D-2pyrim (89)	110	D-Arg-D-3pyridyl-D-Arg (85)	20
D-Arg-D-pyra-D-Arg (87)	80	D-Arg-L-pyra-D-Arg (88)	80

* IC_{50} -Werte in μM

Aus den IC_{50} -Werten wird ersichtlich, daß es sich bei den beiden Tripeptiden $CONH_2$ -D-Arg-D-Trp-D-Arg NH_2 und $CONH_2$ -D-Arg-D-2pyrim-D-Arg NH_2 um sehr gute TAR-Liganden handelt. Zum Vergleich wurde das Tripeptid $CONH_2$ -D-Arg-D-Arg-D-Arg NH_2 herangezogen, welches im Bereich von 4 μM eine halbmaximale Inhibierung zeigt. Auffallend war außerdem, daß das Tripeptid $CONH_2$ -D-Arg-D-3pyridyl-D-Arg NH_2 einen IC_{50} -Wert von 20 μM aufwies, wohingegen das 2-Pyridinyl-Derivat ein

vierfach schlechteres Ergebnis zeigte. Aus diesen Resultaten kann vermutet werden, daß die Position des Stickstoffs in der heteroaromatischen Seitenkette eine wesentliche Funktion besitzt. Die restlichen Tripeptide mit nicht-natürlichen Aminosäuren zeigten IC_{50} -Werte im Bereich um 80 μ M und waren daher im Vergleich deutlich schlechter. In vorangegangenen Arbeiten konnten vor allem Histidin-reiche Sequenzen als potentielle TAR-Liganden im Rahmen einer kombinatorischen Bibliothek identifiziert werden.^[103] Die Sequenz $CONH_2$ -L-His-L-His-L-His NH_2 lieferte jedoch mit einem IC_{50} -Wert von 4,2 mM ein überraschend schlechtes Ergebnis. Dieser Widerspruch konnte jedoch im weiteren Verlauf der Arbeit geklärt werden (vgl. Kapitel 9). Auch Argininamid (**4**) zeichnete sich mit einem IC_{50} -Wert von 1,4 mM als eher schlechter Bulgebinder aus.

7.1 Erweiterung des Assays durch Konkurrenzexperimente

In dem durchgeführten *in vitro* Assay wurden zwar bereits einige Peptide als gute RNA-Liganden identifiziert, die Bulge-Selektivität der Binder konnte mit diesem Assay nicht überprüft werden. Um nichtspezifische Wechselwirkungen abzufangen wurde der modifizierte FRET-Assay in Gegenwart eines fünffachen Überschusses von $tRNA^{Phe}$ durchgeführt.

7.1.1 Titration des Tat-Peptids mit $tRNA^{Phe}$

Bereits in Abwesenheit potentieller Inhibitoren zeigten sich beim modifizierten FRET Assay in Gegenwart von $tRNA^{Phe}$ große Fluoreszenz-Effekte. Dieses Phänomen lieferte bereits einen Hinweis darauf, daß das Tat-Peptid selbst mit der $tRNA$ interagieren kann. Analog zur oben beschriebenen Methode wurde eine Titrationskurve des Tat-Peptids mit $tRNA$ aufgenommen, um eine Bindungskonstante zu ermitteln. Die Berechnung der Konstanten erweist sich als nicht trivial, da dem Tat-Peptid zur Bindung mehrere Loop-Strukturen zur Verfügung stehen. Die Titrationskurve ist in Abb. 7.4 gezeigt.

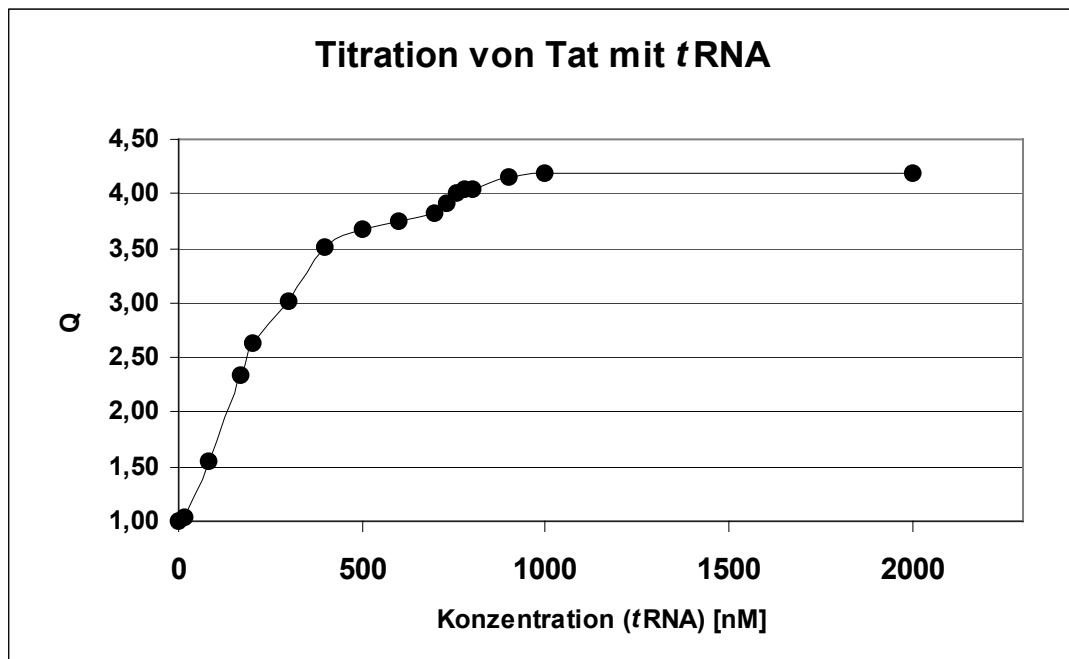


Abb. 7.4: Titration des Tat-Peptides mit tRNA ([Tat]=100 nM; 37°C, pH 7.4)

Trotz der multiplen Bindungsmöglichkeiten des Tat-Peptides an den verschiedenen Loopstrukturen wurde eine Bindungskonstante im Bereich von 100 nM ermittelt. Diese ist jedoch nicht als Absolut-Wert zu sehen, sondern liefert einen Hinweis auf die Größenordnung der Bindungskonstanten. Zur Selektion nicht-spezifischer Wechselwirkungen kam die $tRNA^{Phe}$ daher nicht in Frage. Gleichzeitig zeigte sich damit, daß das ausgewählte Tat-Konstrukt nicht hoch selektiv an den Bulge-Bereich der TAR-RNA bindet. Aus der Literatur waren bereits einige Untersuchungen von Barciszewski et al. bekannt, bei denen eine Komplexbildung von Tat und $tRNA^{Phe}$ z. B. anhand von Gel-Shift und Footprint Experimenten nachgewiesen werden konnte.^{[104],[105]} Die Interaktion erfolgt hierbei in der Dihydrouridin Loop-Region der $tRNA^{Phe}$. Diese Loop-Region weist eine 5'-UGGG Sequenz auf. Diese ist auch in der TAR-Loop vorhanden. (siehe Abb. 7.5)

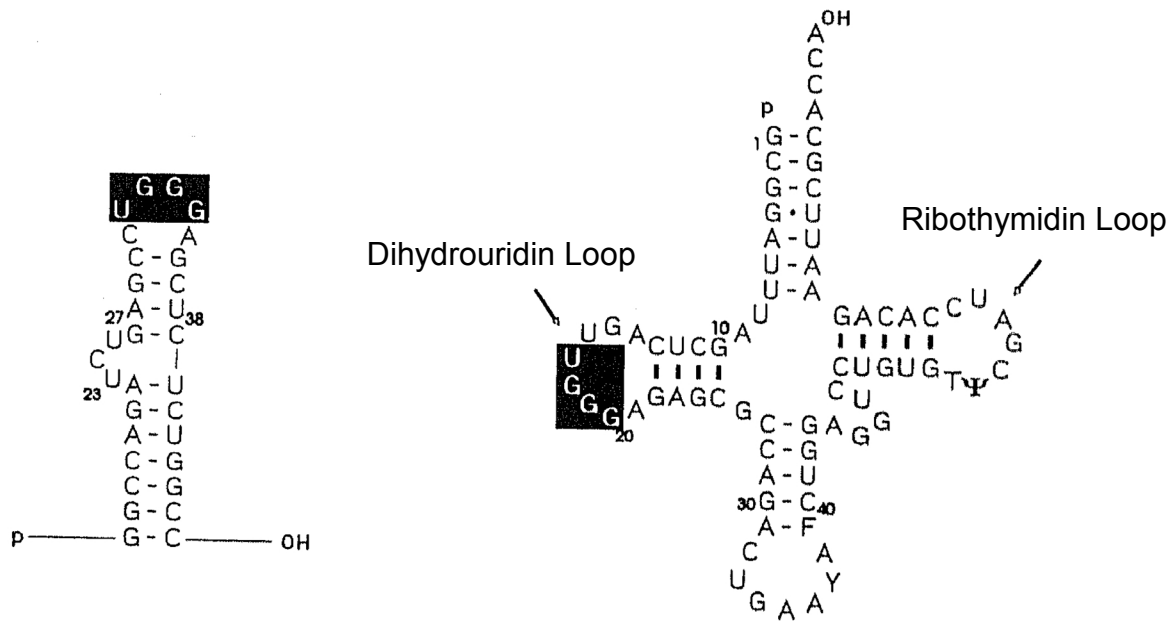


Abb. 7.5: Die Strukturen von TAR-RNA und tRNA

Über die Bindungsstärke des Tat-tRNA Komplexes wurden jedoch keine Aussagen getroffen. Die Affinität des Tat-11mers zum 5'UGGG Loop-Bereich wurde daher näher untersucht. Zum einen sollte hierbei geklärt werden, ob im uns vorliegenden modifizierten FRET Assay im Konzentrationsbereich von 100 nM (Tat-Peptid und TAR-RNA) eine Beeinflussung des Tat-Peptids durch Loop-Bindung erfolgt. Die vermutete Affinität des Tat-Peptids zur Loop-Region der TAR^{wt}-RNA brachte den Anstoß zum Aufbau eines neuen *Bulgeless*-TAR Assays. Dieser Assay sollte die Unterscheidung von Loop- und Bulge-Liganden ermöglichen. Zu diesem Zweck erfolgte die Transkription einer TAR^{bulgeless}-Mutanten. Hierbei wurde zunächst untersucht, ob sich bei der Titration des Tat-Peptids (100 nM) mit TAR^{bulgeless}-RNA Fluoreszenz-Effekte zeigen. Schematisch war dieser Assay analog zum TAR^{wt}-Assay aufgebaut. Der Komplex des Tat-Peptids sollte bei Anregung (544 nm) einen maximalen Fluoreszenz-Effekt zeigen, wohingegen in ungebundener Form ein Quenchen des Signals erfolgen sollte.

Zur Bestimmung der Affinität des Tat-Peptids zur *Bulgeless*-TAR-RNA (TAR*bl*) wurde wie in den vorangegangenen Untersuchungen eine Titration durchgeführt, die in Abb. 7.6 dargestellt ist.

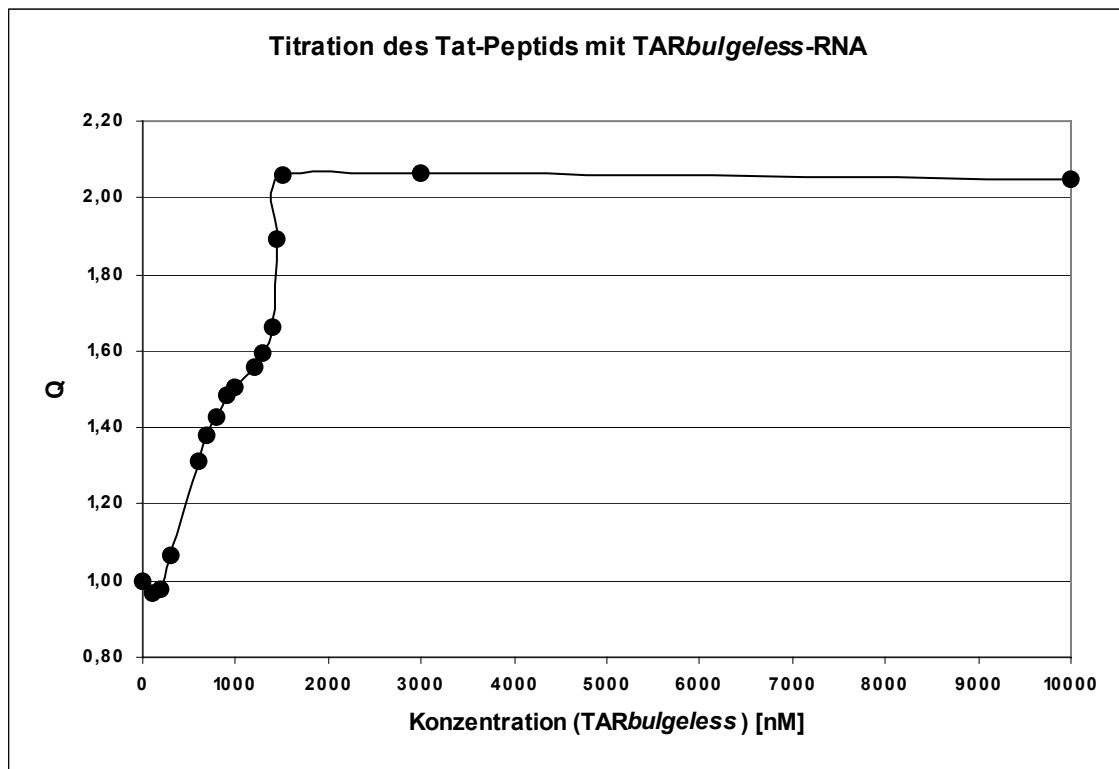


Abb. 7.6: Titration des Tat-Peptids (100 nM) mit TAR*bul*, 37°C, pH 7.4

Anhand des Kurvenverlaufs lässt sich eine Wechselwirkung von Tat-Peptid und TAR*bul* eindeutig belegen (vgl. Abb. 7.6). Der Sättigungsbereich war jedoch erst bei einer Konzentration von 1500 nM erreicht. Im Vergleich zur TAR*w*t zeigt das Tat-Peptid eine wesentlich schlechtere Affinität zur TAR*bul*. Aufgrund des doch recht steilen Kurvenverlaufs konnte keine akzeptable Berechnung der Bindungskonstante durchgeführt werden. Sie erhöht sich jedoch beim Vergleich mit der TAR*w*t um mehr als den Faktor 10. Es war desweiteren von Interesse, ob sich die Affinität des Tat-Peptids zur Loop-Region auch auf die Ergebnisse aus dem TAR*w*t-Assay auswirkt. Bei der Titration der TAR*bulgeless*-RNA zeigte sich jedoch bei einer Konzentration von 100 nM kein Fluoreszenz-Effekt. Im TAR*w*t-Assay lässt sich die Affinität des Tat-Peptids zur Loop-Region daher vernachlässigen. Dieser wird erst bei höheren Konzentrationen bedeutsam.

Anhand einiger Verbindungen konnte ein Ranking bezüglich einer Loop-Affinität erstellt werden. Der TAR*bulgeless*-Assay wurde hierbei analog zum zuvor beschriebenen TAR*w*t-Assay durchgeführt. Als Konzentration der TAR*bul* wurde die Sättigungskonzentration aus der Tat-TAR*bul* Titration gewählt. Es erfolgte die Bestimmung von IC₅₀-Werten einiger ausgewählter Loop- und Bulgebinder. Hierbei

ist zu beachten, daß die IC_{50} -Werte aus beiden Assays aufgrund der sehr unterschiedlichen Bindungskonstanten nicht gleichgesetzt werden dürfen. Neben dem mittelmäßigen Bulgebinder Argininamid wurde desweiteren auch $CONH_2$ -L-His-L-His-L-HisNHR (mit acetylierter und freier Aminofunktion) als potentieller Vertreter der Loopbinder untersucht. Es wurden folgende IC_{50} -Werte bestimmt (vgl. Tab. 7.7):

Tab. 7.7: IC_{50} -Werte aus dem TAR bl -Assay

Verbindung	IC_{50} -Werte (TAR bl) ^[a]
$CONH_2$ -L-His-L-His-L-HisNHAc (102)	500 μ M
$CONH_2$ -L-His-L-His-L-HisNH $_2$ (93)	15 μ M
$CONH_2$ -D-Arg-D-Arg-D-ArgNH $_2$ (90)	5 μ M
$CONH_2$ -D-Arg-D-2pyrim-D-ArgNH $_2$ (86)	150 μ M
Argininamid (4)	10 mM

^[a] [Tat]= 100nM; [TAR $bulgeless$]= 1500 nM; 37°C; pH 7.4

Aus den Messungen wird deutlich, daß $CONH_2$ -D-Arg-D-Arg-D-ArgNH $_2$ aus dieser Reihe den besten Loopbinder darstellt. Als Ursache für die unselektive Interaktion des Peptids mit dem Phosphatrückgrat der RNA können die positiv geladenen Seitenketten des Arginins angenommen werden. Trotz der strukturellen Ähnlichkeit des Tripeptids $CONH_2$ -D-Arg-D-2pyrim-D-ArgNH $_2$ zeigte diese Verbindung im bulgeless Assay erst bei 150 μ M eine 50 %ige Verdrängung des Tat-Peptids und hat somit im Vergleich zum vorangegangenen Tripeptid eine 30 mal schlechtere Affinität zur Loop-Region. Im TAR w t-Assay hingegen wiesen beide Substanzen nahezu gleiche IC_{50} -Werte auf (5 bzw. 2 μ M). Die deutlich Abstufung in diesem Assay zeigt, daß $CONH_2$ -D-Arg-D-2pyrim-D-ArgNH $_2$ eine deutlichere Präferenz zur Bulgeregion besitzt, wohingegen $CONH_2$ -D-Arg-D-Arg-D-ArgNH $_2$ nicht selektiv bindet.

Der Loopbinder $CONH_2$ -L-His-L-His-L-HisNH $_2$ (IC_{50} = 15 μ M) zeigte im Vergleich zum Derivat (**90**) eine ca. dreifach schlechtere Loop-Affinität. Auffallend war hierbei, daß die acetylierte Verbindung (**102**) eine mehr als 30-fache Abnahme der Affinität bewirkte. Die entstandige Aminofunktion scheint daher die Bindung an der Loopregion wesentlich zu unterstützen. Argininamid war außerdem bereits aus NMR-Studien als Bulgebinder identifiziert worden und stellte in dieser Reihe erwartungsgemäß den schlechtesten Loopbinder dar. Wie für Argininamid konnte auch für das Peptid $CONH_2$ -D-Arg-D-2pyrim-D-ArgNH $_2$ in NMR-spektroskopischen Untersuchungen eine Bindung an der Bulgeregion der TAR-RNA nachgewiesen

werden. Dieses ist ein weiterer Beweis dafür, daß das Pyrimidinyl-Peptid eine hohe Affinität zur Bulgeregion zeigt. Aufgrund der positiven Ladungen der flankierenden Arginine bindet dieses Peptid in Abwesenheit der Bulge-Region auch an andere Strukturen.

7.2 Untersuchungen mit der HIV-2 TAR-RNA

Neben der HIV-1 TAR-RNA wurde für den besten Liganden $\text{CONH}_2\text{-D-Arg-D-2pyrim-D-ArgNH}_2$ die Affinität zur Bulge Sequenz der HIV-2 TAR-RNA bestimmt. Dieses war vor allem wegen der anschließenden NMR-spektroskopischen Untersuchungen von besonderem Interesse. Die TAR-Sequenz der HIV-2 unterscheidet sich in der Bulgeregion, da hier im Gegensatz zur HIV-1 keine UCU sondern eine UU Region vorhanden ist (Sequenz siehe Abb. 8.1). Es wurde daher zunächst die Affinität des Tat-Peptids zu dieser Bulge-Sequenz untersucht (vgl. Abb. 7.7). Wie bereits bei der Titration der HIV-1 TAR-RNA, läßt sich im unteren Konzentrationsbereich (50 nM HIV-2 TAR-RNA) eine 2:1 Stöchiometrie von Tat:TAR vermuten, der in eine 1:1 Stöchiometrie übergeht. Anhand der Titrationskurve ließ sich unter der Annahme einer 1:1 Stöchiometrie eine Bindungskonstante von 1,6 nM bestimmen.

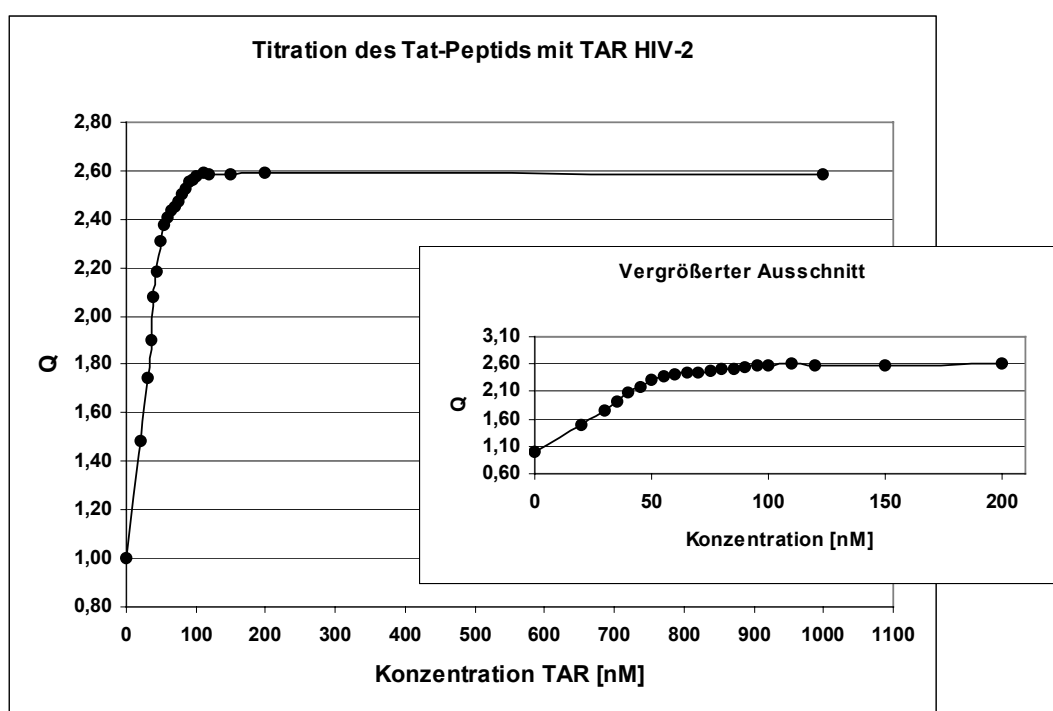


Abb. 7.7: Titration des Tat-Peptids (100nM) mit HIV-2 TAR-RNA, pH7.4

Analog zur oben beschriebenen Methode wurde ein IC_{50} -Wert von 2 μM für das Tripeptid $CONH_2$ -D-Arg-D-2pyrim-D-Arg NH_2 bestimmt. Der Pyrimidinyl-Ligand zeigte somit für beide HIV-TAR Varianten gleiche Affinität. In diesem Fall lassen sich die IC_{50} -Werte sehr gut miteinander vergleichen, da das Tat-Peptid nahezu gleiche Bindungskonstanten zu den TAR-RNAs aufwies.

Die interdisziplinäre Zusammenarbeit innerhalb des Sonderforschungsbereichs 579 ermöglichte hierbei die weitergehende Untersuchung der vielversprechenden Kandidaten. In der Arbeitsgruppe von Dr. U. Dietrich wurde der Effekt der Liganden in verschiedenen Zellkulturassays untersucht. Um Aufschluß über die Bindungsregion zu erhalten wurde der Komplex aus $CONH_2$ -D-Arg-D-2pyrim-D-Arg NH_2 und TAR-RNA (HIV-1 und HIV-2) NMR-spektroskopisch untersucht. Diese Experimente wurden durch die Zusammenarbeit mit den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. H. Schwalbe/Dr. J. Wöhnert ermöglicht und von J. Ferner durchgeführt.

7.3 In vivo Untersuchungen in Zellkulturassays

Nachdem aus den *in vitro* Studien bereits vielversprechende Liganden identifiziert werden konnten, sollten weitere Untersuchungen mittels eines Zellkultur-Assays durchgeführt werden. Dr. U. Dietrich (Georg Speyer Haus) entwickelte zu diesem Zweck einen Reporter-gen-Assay (Assay I), basierend auf HeLaP4 Zellen. Der schematische Aufbau ist in Abb. 7.8 zu sehen.

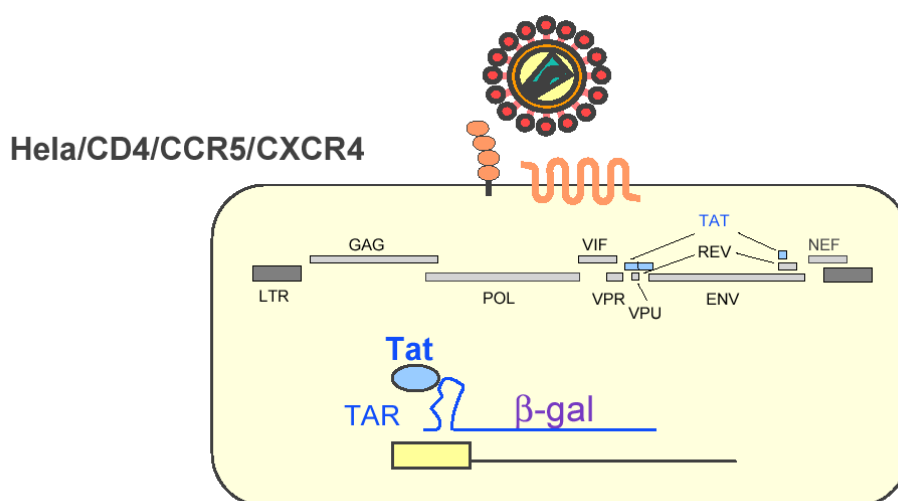


Abb. 7.8: Schematischer Aufbau des Zellassays

Neben den HIV-Rezeptoren CD4, CCR5 und CXCR4, die für eine erfolgreiche Infektion mit HIV erforderlich sind, enthalten die Zellen ein beta-gal Gen unter Kontrolle einer HIV-1 LTR. Durch die Wechselwirkung des Tat-Peptids mit der TAR-RNA wird die Transkription angeschaltet und nachfolgend das β -gal-Gen transkribiert. Die Zellen sind daraufhin blau anfärbbar oder lassen sich am Luminometer (Chemilumineszenz) vermessen. In der folgenden Abbildung (vgl. Abb. 7.9) ist die Inhibierung des Assays mit einem Tat 10mer gezeigt.

Anhand der Abbildung wird deutlich, daß mit steigender Zugabe an Tat 10mer eine Inhibierung der Expression des Reportergens und damit der HIV-Produktion erfolgt. Die Inkubationsdauer betrug zwei Tage. Für das Tat 10mer erhielt man einen IC_{50} -Wert von 20 μ M.

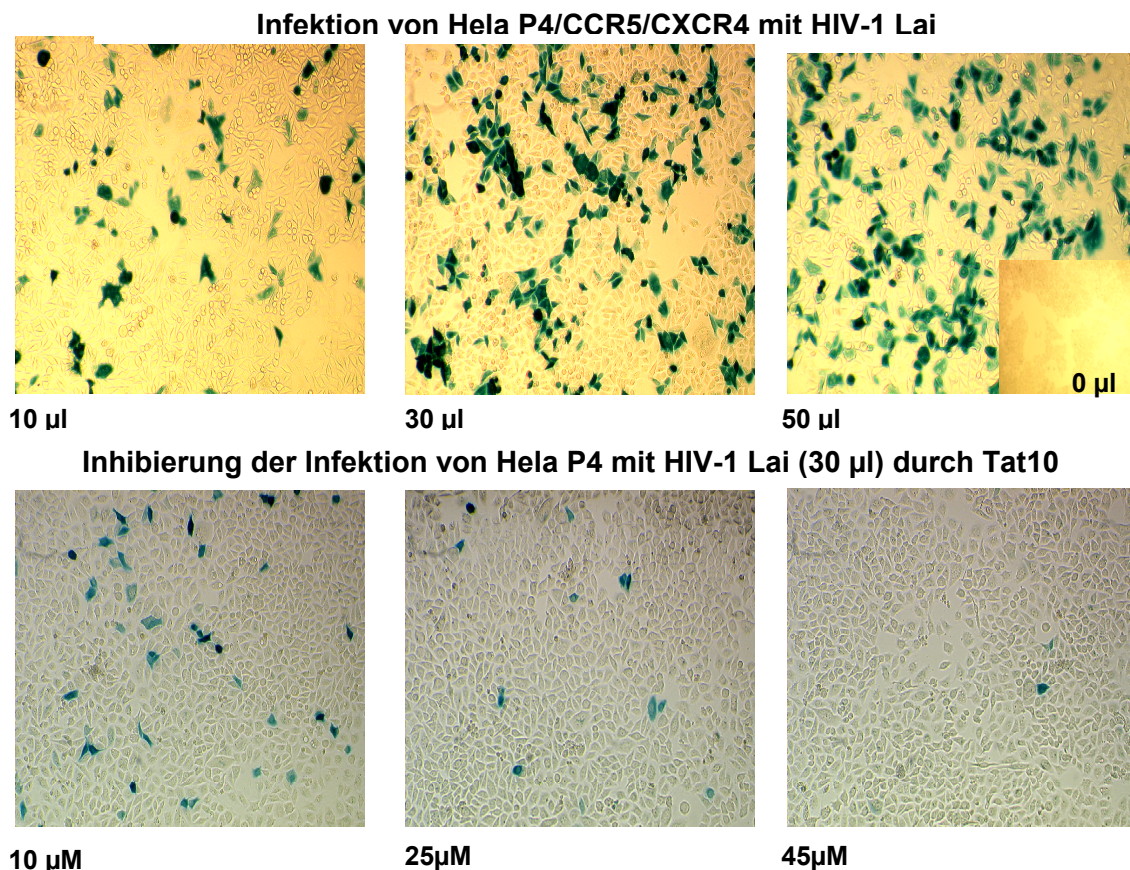


Abb. 7.9: Visualisierung des Zellassays durch β -gal-Aktivität (Assay I)

Für die Tripeptide konnten folgende halbmaximale Hemmeffekte (IC_{50} (μM), Assay I) beobachtet werden (vgl. Tab. 7.8):

Tab. 7.8: IC_{50} -Werte der Tripeptide aus der Zellkultur

Peptid	$IC_{50}^{*[a]}$	Toxizität	Inhibitor	$IC_{50}^{*[b]}$
tat 10 mer (Positivkontrolle)	20		A	
CONH ₂ -D-Arg-D-2pyrim-D-ArgNH ₂ (86)	40	n.i.Kl.	A	< 200
CONH ₂ -D-Arg-L-pyra-D-ArgNH ₂ (88)	750	2 mM	E	< 500
CONH ₂ -D-Arg-D-2pyr-D-ArgNH ₂ (84)	500	2 mM	E	< 500
CONH ₂ -D-Arg-D-Trp-D-ArgNH ₂ (94)	100	500 μM	A	500
CONH ₂ -D-Arg-D-3pyr-D-ArgNH ₂ (85)	500	n.i.Kl.	E	500
CONH ₂ -D-Arg-D-pyra-D-ArgNH ₂ (87)	500	k. A.	k. A.	k. A.
CONH ₂ -D-Arg-D-Arg-D-ArgNH ₂ (90)	>500	k. A.	k. A.	k. A.

* alle Konzentrationsangaben in μM

[a] IC_{50} -Werte aus dem Assay I (Peptid/Virus-Zugabe gleichzeitig)

[b] IC_{50} -Werte aus dem Assay II (Peptid-Zugabe nach Virus-Zugabe)

n.i.Kl. = nicht im Bereich der Inhibierungskonzentration

A = antiviraler Effekt

E = Entry-Inhibitor

Da die Hemmung der beta-gal Aktivität auch durch Toxizitätseffekte der Peptide hervorgerufen werden könnte, wurde ein entsprechender Toxizitäts-Assay durchgeführt. Eine Toxizität der Verbindungen konnte anhand der Daten ausgeschlossen werden, da sich entweder nur bei extrem hoher Konzentration (2mM) Effekte nachweisen ließen, bzw. sich im inhibierenden Konzentrationsbereich keinerlei toxische Wirkung zeigte. Die Virus- und Peptidzugabe erfolgte in diesem Assay gleichzeitig. Eine verminderte β -gal-Aktivität kann daher auch durch eine Hemmung des Virus-Eintritts hervorgerufen werden. Zu diesem Zweck wurde ein weiterer Assay (Assay II) aufgebaut. Hierbei wurden die Zellen zunächst mit dem Virus inkubiert. Die Zugabe der Inhibitoren erfolgte erst im Anschluß daran. Für Tripeptide, die auch in diesem Assay eine Wirkung zeigen, kann eine Hemmung auf Entry-Ebene nahezu ausgeschlossen werden. In diesem Assay hatten die Tripeptide D-Arg-L-pyrazinyl-D-Arg, D-Arg-D-2pyridyl-D-Arg und D-Arg-D-3pyridyl-D-Arg keine Wirksamkeit. Es

handelt sich demnach um Entry-Inhibitoren mit IC_{50} -Werten im Bereich von 500 μ M. Für zwei weitere Peptide, D-Arg-D-Trp-D-Arg ($IC_{50} \sim 500 \mu$ M) und vor allem D-Arg-D-2pyrim-D-Arg ($IC_{50} < 200 \mu$ M), ließen sich jedoch erhebliche inhibitorische Effekte nachweisen. Die Tat-inhibierende Wirkung dieser Peptide kann somit bestätigt werden.

Beide TAR-Liganden wurden zusätzlich im weiteren Verlauf noch Langzeit-Inhibitions-Studien unterzogen. In diesen Versuchen wurde nach der Infektion die Virusmenge im Kulturüberstand (p24 Antigen im ELISA) gemessen. Es wurden hierbei zwei parallele Versuche durchgeführt. Während im ersten Ansatz nach zwei Tagen eine erneute Zugabe des Peptids erfolgte, wurde hierauf beim zweiten Experiment verzichtet. Aus den erhaltenen Ergebnissen wird ersichtlich, daß zwischen beiden Experimenten eine hohe Vergleichbarkeit besteht. Unter allen Bedingungen konnte jedoch eine Inhibierung des Virus gezeigt werden. Die zugehörigen Graphiken sind hier dargestellt (Abb. 7.10 und Abb. 7.11).

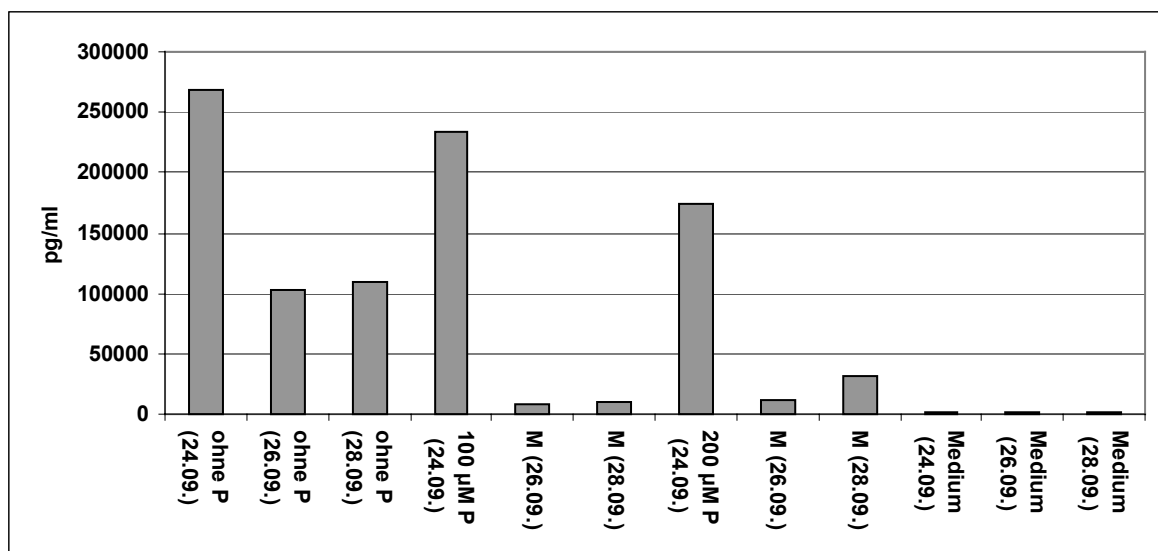


Abb. 7.10: 120 μ l Viruszugabe ohne erneute Zugabe von $CONH_2$ -D-Arg-D-2pyrim-D-Arg NH_2

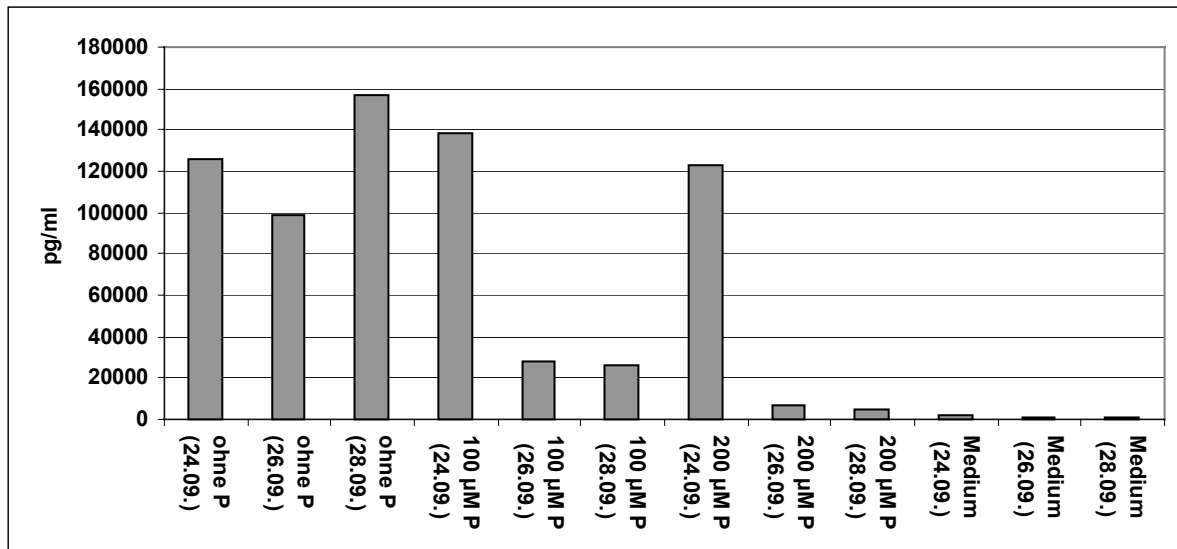


Abb. 7.11: 120 µl Viruszugabe mit erneuter Zugabe von $\text{CONH}_2\text{-D-Arg-D-2pyrim-D-ArgNH}_2$:

Im laufenden Projekt ist es nun das Ziel, die beta-gal Aktivität direkt über Tat anzuschalten, ohne daß ein Virus zugegeben werden muß. Hierzu wird ein Tat-Expressionsplasmid in P4-Zellen transfiziert. Reproduktion der Inhibition der gezeigten Peptide gibt dann den endgültigen Beweis, daß es sich um Tat-TAR-Inhibitoren handelt.

8 NMR-Struktur Aufklärung

Die NMR-Spektroskopie hat bei der Untersuchung von Proteinen und Nucleinsäuren in den vergangenen Jahren an Bedeutung gewonnen.^[106] Um zu bestätigen, daß es sich beim identifizierten Pyrimidinyl-Liganden wirklich um einen Bulgebinder handelt, wurden NMR-spektroskopische Experimente zur Aufklärung der RNA-Ligand Wechselwirkung in den Arbeitskreisen Dr. J. Wöhnert / Prof. H. Schwalbe von Herrn J. Ferner durchgeführt. Als Ligand wurde das Tripeptid CONH₂-D-Arg-D-2pyrimidinyl-D-ArgNH₂ gewählt, welches bereits zuvor durch hohe biologische Aktivität aufgefallen war. Um den Einfluß von strukturellen Veränderungen im Tripeptid auf die Bindung zur TAR-RNA zu untersuchen, wurde auch das ähnliche CONH₂-D-Arg-L-pyrazinyl-D-ArgNH₂ eingesetzt (vgl. Abb. 8.1). Als Referenzverbindung diente L-Argininamid, dessen Komplex mit HIV-2 TAR-RNA bereits in den vergangenen Jahren intensiv untersucht wurde. Von Williamson wurde gezeigt, daß es sich hierbei um einen spezifischen Bulgebinder handelt, der einen Shift der Bulge-Protonen bewirkt.^[40] Das Argininamid interagiert hiernach über Wasserstoffbrückenbindungen mit G26, wobei die Guanidiniumseitenkette mit den Basen U23 und A22 einen Sandwichkomplex bildet. Um einen Vergleich zwischen den Bindungseigenschaften der nicht-natürlichen Tripeptide und L-Argininamid durchzuführen wurde das Experiment von Williamson et al. wiederholt. Die HIV-2 TAR-RNA weist eine 2 nt große UU Bulge auf. Von Dr. M. Hennig (Scripps Research Institute) wurde eine Probe der HIV-2 TAR-RNA bereitgestellt. Die Titration der TAR-RNA (HIV-2) mit Argininamid sorgte für einen kontinuierlichen Shift der NMR-Signale, die auf einen schnellen Austausch von gebundener und freier RNA hindeuten. Das dazugehörige Spektrum und die Struktur der RNA sind in der folgenden Abbildung dargestellt. Das Tripeptid CONH₂-D-Arg-L-pyrazinyl-D-ArgNH₂ zeigte ebenfalls Bindung an der Bulgeregion (vgl. Abb. 8.2). Da bereits bei einem geringem Verhältnis von RNA zu Ligand ein starker Shift auftritt, kann davon ausgegangen werden, daß dieses Peptid besser als Argininamid bindet. Die beste Bindung wurde mit dem Tripeptid CONH₂-D-Arg-D-2pyrim-D-ArgNH₂ beobachtet. Auch hier ist ein Shift der Bulge-Protonen zu beobachten. Um mögliche Bindungsunterschiede zur TAR-RNA HIV-1 aufzuzeigen, wurde auch damit eine Titration durchgeführt. Die Bindungsmuster der Tripeptide an die TAR-RNA (HIV-1) ähneln stark dem Muster für HIV-2, wobei die Bindung etwas schwächer ist.

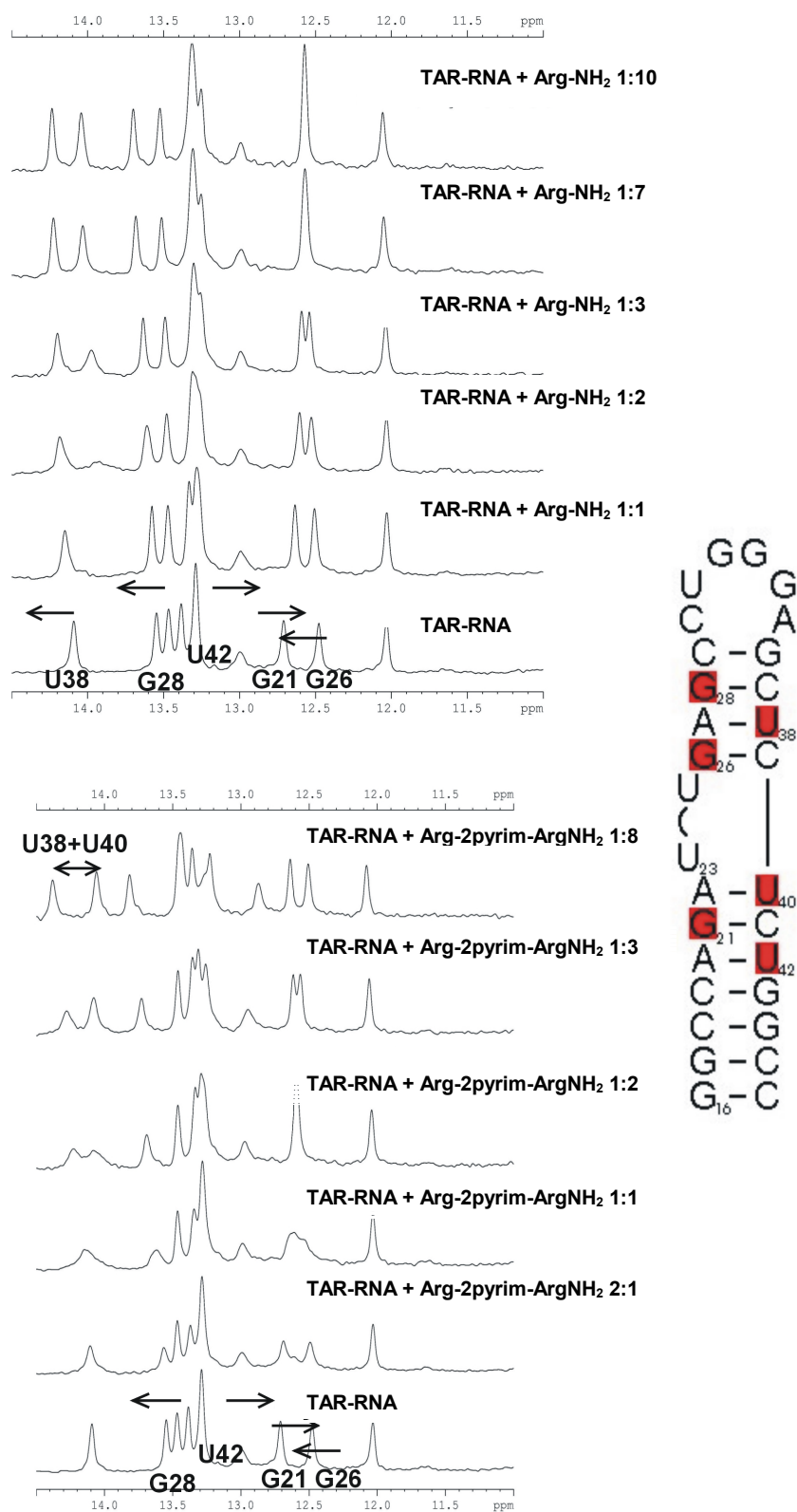


Abb. 8.1: Titration der HIV-2 TAR-RNA mit Argininamid und $\text{CONH}_2\text{-D-Arg-D-2pyrim-D-ArgNH}_2$

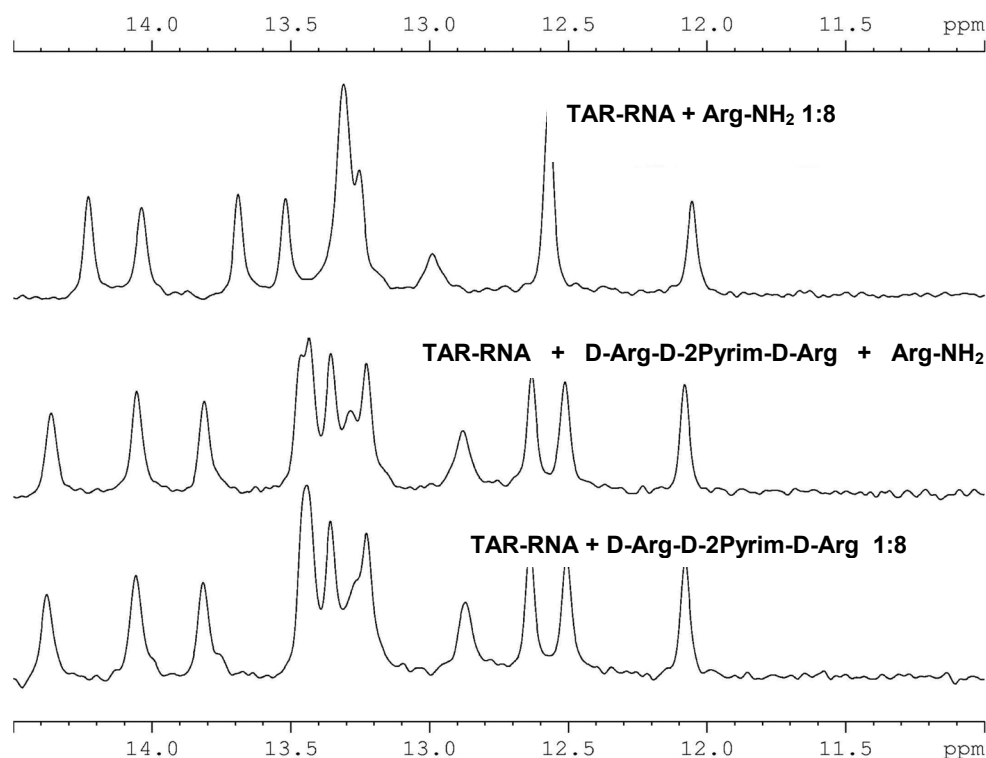


Abb. 8.2: *Kompetitionsexperimente*

Aufgrund der ähnlichen Bindungsmodi von Argininamid und $\text{CONH}_2\text{-D-Arg-D-2pyrim-D-ArgNH}_2$, wurde ein Kompetitionsexperiment durchgeführt (vgl. Abb. 8.2). Das Tripeptid konnte selbst bei hohen Konzentrationen an Argininamid nicht verdrängt werden. Daraus resultiert, daß $\text{CONH}_2\text{-D-Arg-D-2pyrim-D-ArgNH}_2$ wesentlich stärker an die TAR-RNA bindet als Argininamid. Anhand von 2D- und 3D-NMR-Experimenten konnten weitere Informationen über den RNA/Ligand Komplex erhalten werden. Für die Dissoziationskonstante wurde hierbei ein Wert von $500\ \mu\text{M}$ erhalten. Dieses Ergebnis erscheint zunächst erheblich schlechter, als die ermittelten Werte aus den vorangegangenen Assays. Es ist jedoch zu beachten, daß bei den NMR-Messungen ein Kaliumphosphat-Puffer zugesetzt wurde. Um die Wirkung des Puffers zu untersuchen, wurde eine Titration der HIV-1 TAR-RNA in Gegenwart dieses Puffers durchgeführt. Hierbei zeigte sich, daß der Puffer ganz erhebliche Auswirkungen auf die Affinität des Tat-Peptids hat. Aufgrund sehr starker Signal-Schwankungen war es nicht möglich eine Bindungskonstante zu ermitteln. Tendenziell verschlechtert sich die Bindung jedoch mindestens um Faktor 10. Die schlechtere Bindungskonstante aus der NMR-Untersuchung ist daher eindeutig auf den Puffer zurückzuführen. Der Versuch, die Komplexe in Gegenwart des TK-Puffers

NMR-spektroskopisch zu vermessen, war nicht erfolgreich, da hier nicht die erforderliche Auflösung zu erreichen war.

Aus den Versuchen konnten somit zwei Tripeptide bestimmt werden, die beide ein besseres Bindungsverhalten zeigen als das entsprechende Argininamid. Die definierten Komplexe mit geringen Linienbreiten im NMR bilden die ideale Voraussetzung zur Strukturaufklärung. Sie ist Gegenstand derzeitiger Untersuchungen.

9 Bibliotheken

Kombinatorische Chemie ist ein junger, aber inzwischen sehr intensiv genutzter Zweig in den Naturwissenschaften. Zu Beginn der 80er wurden einige sehr innovative synthetische Methoden veröffentlicht, die Theorie und Praxis zur Synthese und zum Design von neuen Pharmacophoren revolutionierten.^{[108],[109],[110],[111],[112]} Die ersten Versuche zur Herstellung einer peptidischen Bibliothek wurden 1982 von Furka notariell hinterlegt, jedoch nie in einem renommierten Journal veröffentlicht. Dieses zeigt, dass die Bedeutung der Synthesemethode zunächst erheblich unterschätzt wurde.^[113] 1984 wurde von Geysen die Synthese und biologische Charakterisierung einer Peptid-Bibliothek mit mehrere hundert Komponenten veröffentlicht.^[108] Ein Jahr später berichtete die Arbeitsgruppe Houghten von der Verwendung sogenannter tea bags, die die Synthese einer großen Bibliothek mit mehreren hundert Mitgliedern ermöglichte.^[114] 1991 konnten von Furka et al. und Lam et al. bedeutende Fortschritte auf dem Gebiet der kombinatorischen Chemie erzielt werden.^{[115],[116],[117]} Mithilfe der „mix and split“ Methode wurde von Lam et al. eine Bibliothek mit 2.5 Mio. Peptiden an der festen Phase synthetisiert, wobei gleichzeitig das „one bead-one compound“ Konzept eingeführt wurde. Hierbei wurde das Harz zunächst aliquotiert und unterschiedliche, bereits voraktivierte Aminosäuren hinzugefügt. Nach vollständiger Kupplung wurde das Harz vereinigt, gewaschen, die terminale Aminofunktion entschützt und wieder aliquotiert. Dieser Vorgang wurde mehrere Male wiederholt. Durch die Kombination der Verbindungen A1 bis AN mit den Verbindungen B1 bis BN war es gelungen, in sehr kurzer Zeit mit wenigen Arbeitsschritten zu einer großen Anzahl an Verbindungen zu kommen, wobei jede Harzkugel nur eine einzige Peptidsequenz trug. Nach Entschütung der Seitengruppen stand die Bibliothek –je nach Wahl des Harzes- zum Beispiel zum „on bead“ Screening bereit. Dieser neue Zweig der Chemie stellte jedoch gleichzeitig hohe Anforderungen an die analytischen Methoden, da die Sequenzen der jeweiligen Bibliothek nach dem Screening eindeutig identifizierbar sein mußten. Es wurden Kodierungsschemata entwickelt, die eine Zuordnung der Verbindungen ermöglichte. Diese sind im folgenden Kapitel beschrieben.

9.1 Zuordnung der Sequenzen.

Für die Untersuchung von Peptid-Bibliotheken wurde zunächst das Elektrospray-MS eingesetzt, welches gleichzeitig Auskunft über die Reinheit der Bibliothek geben kann.^[118] In Verbindung mit MS/HPLC, GC oder MS-MS ist eine Analytik von Mischungen möglich. Für die Identifizierung kleinster Substanzmengen, wie es zum Beispiel häufig beim „on bead screening“ der Fall ist (siehe unten), reicht diese „massenspezifische“ Methode nicht mehr aus. Auch bei der Identifizierung von enantiomeren Verbindungen ist das Limit dieser Methode erreicht. Es wurden daher entsprechende Reporter-Systeme eingeführt, um eine eindeutige Sequenzanalyse zu ermöglichen. Eine kleine Auswahl sei an dieser Stelle beschrieben.

Zur Kodierung einer Bibliothek wurden von Kerr et al. und Nicolaiev et al. spezielle Peptid-Kodes benutzt.^[119] Nicolaiev et al. nutzte die Seitenkette des Lysins zum Aufbau einer nicht-peptidischen Bibliothek. Parallel dazu wurde am N-Terminus eine Kodierung mittels Peptiden eingeführt. Screening der Bibliothek und nachfolgende Peptidsequenzierung führte zur Struktur der aktiven Komponente. Diese Methode birgt jedoch den Nachteil, daß die Reportermoleküle und die zu untersuchende Komponente im Verhältnis 1:1 vorliegen. Beim Screening darf daher der Effekt, der möglicherweise durch die Kodierung ausgelöst wird, nicht unterschätzt werden.

Eine völlig neue Methode der Kodierung wurde von Brenner und Lerner vorgestellt.^[120] Sie benutzten sogenannte DNA-Tags, die innerhalb einer speziellen Sequenz einen binären Code beinhalten. Der DNA-Tag einer aktiven Verbindung wurde mittels PCR amplifiziert und anschließend über DNA-Sequenzierung dekodiert. Obwohl für die Kodierung nur sehr wenig vom DNA-Tag benötigt wird, ist diese Methode aufgrund der chemischen Labilität der Oligonucleotide nur sehr begrenzt einsetzbar.

9.1.1 Hochfrequenz Tags

Die chemische Kodierung kann die eigentliche Bibliothekssynthese bzw. das Screening der Liganden beeinflussen. Eine Alternative bieten sogenannte Hochfrequenz-Tags. Diese Mikrochips werden elektronisch kodiert und zusammen mit dem Harz in Mikroreaktoren verwendet. 1995 wurden auf diese Weise von Nicolaou et al. 24 Peptide mittels eines 3x2x2 Split and Mix-Musters hergestellt.^[121] Mit jedem Kupplungsschritt werden die Daten auf dem Chip gespeichert, so daß abschließend anhand dieser Angaben eine Dekodierung erfolgen kann. Im Gegensatz zu anderen

Methoden ist die Anzahl der Peptide bei dieser Anwendung jedoch auf die Anzahl der verwendeten Mikroreaktoren beschränkt.

9.1.2 Photolytisch spaltbare Reportermoleküle

Still et al. kodierten ihre Bibliothek über einen chlorphenolischen binären Code, der über einen photolabilen Linker an das Harz gebunden wurde.^[122] Nach dem Liganden-Screening wurden die Reportermoleküle photolytisch von der Polymerkugel gespalten und über GC-ECD analysiert. Aufgrund der hohen Sensitivität der Methode können selbst kleinste Mengen an Halogenaromaten detektiert werden. Als Variation dieser Methode wurde ein Carben-Tag beschrieben, der durch Insertion am polymeren Träger an der festen Phase gebunden wird.^{[123],[124]} Die Abspaltung des Reportermoleküls erfolgt über Oxidation mit Cer-Ammoniumnitrat. Nach Silylierung der abgespaltenen Tags wurden diese ebenfalls mittels GC-ECD detektiert.

9.1.3 Screening mit einem “on bead” Bindungs-Assay

Mit der Entwicklung von on-bead Bindungs-Assays erhielt man einen schnellen Zugriff auf kombinatorisch hergestellte Liganden, die mit einem entsprechenden Akzeptor interagieren. Obwohl die Festphasen-Peptid-Synthese seit der Einführung von R. Merrifield 1965 bereits sehr etabliert war, wurde erst vor ungefähr einem Jahrzehnt von einem Festphasen-Screening berichtet.^{[125],[116]} Grund dafür war die Bio-Inkompatibilität der Polymerkugeln. Diese müssen sowohl für die Synthese als auch für das anschließende Screening bestimmten Anforderungen entsprechen. Während für die Synthese ein Quellen des Harzes in organischen Lösungsmitteln unumgänglich ist, erfordert die Durchführung des Bindungsassays ein wässriges Medium.^[126] Desweiteren dürfen weder Harz noch Linker oder Spacer einen Einfluß auf das Bindungsverhalten im Assay ausüben.

Das potentielle Akzeptormolekül benötigt jedoch eine Markierung. Diese kann in Form eines Enzyms, eines Fluoreszenz-Labels, eines Radionuclids oder eines Chromophors erfolgen. Alternativ erfolgt die Kombination eines zweiten Reagenzes mit den bereits genannten Tags. Beispielsweise läßt sich das primäre Akzeptormolekül biotinylieren und mit einem Streptavidin-alkalische Phosphatase Konjugat kombinieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Methode des „on bead Screenings“ verwendet. Die Akzeptormoleküle (RNA) wurden in diesem Fall fluoreszenz-markiert und die Bibliothek anschließend inkubiert. Diese Methode bietet den Vorteil, sehr schnell eine große Anzahl von Liganden zu detektieren und isolieren. Eine Sequenzbestimmung der gefundenen Liganden ist in kurzer Zeit möglich. Da nur sehr wenig Substanz für die Herstellung der Bibliothek benötigt wird, ist diese Methode zugleich sehr Ressourcen-sparend. Im folgenden Kapitel ist zunächst die Herstellung der Bibliotheken und die Optimierung der Synthesebedingungen dargestellt. Im Anschluß daran wird die Inkubation mit fluoreszenz-markierter RNA zur Auffindung potentieller RNA-Liganden näher erläutert.

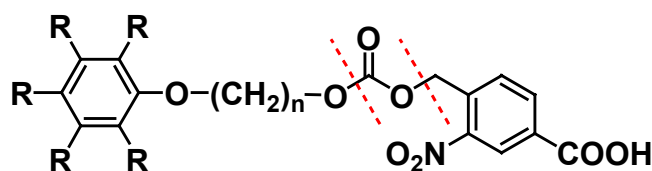
9.2 Eigene Arbeiten

Nach dem erfolgreichen Einbau der nicht-natürlichen Aminosäuren in Tripeptide des Musters D-Arg-X-D-Arg und den vielversprechenden Ergebnissen aus den *in vitro* und *in vivo* Experimenten, wurde die Suche nach RNA-Liganden durch den Einsatz einer kodierten kombinatorischen Bibliothek intensiviert. Im Rahmen einer Test-Bibliothek sollten hierbei zunächst die optimalen Bedingungen für die Herstellung einer Tripeptid-Bibliothek ermittelt werden. Nachdem D-Arg bereits positiv aufgefallen war, wurden auch D- und L- Lys, sowie L-Asn, deren hohe TAR-RNA-Affinität bereits in anderen Publikationen beschrieben wurde.^[127] Neben D-Phe, das eine Präferenz für stacking-Wechselwirkungen zeigen sollte, wurde außerdem auch D-Leu als Vertreter für rein hydrophobe Wechselwirkungen mit RNA in der Bibliothek eingesetzt. Da in vorangegangenen Arbeiten^[129] vor allem L-Histidin-reiche TAR-Liganden identifiziert wurden, fand auch diese Aminosäure einen Einsatz in der Bibliothek. Wie aus der Auswahl schnell ersichtlich wird, handelt es sich in der Mehrzahl um D-Aminosäuren. Im Gegensatz zu den bekannten L-Aminosäuren, werden diese im allgemeinen in Zellassays langsamer durch die Proteasen abgebaut und zeigen daher eine längere Stabilität in den Zellkulturen. Die eingesetzten Aminosäuren sind nochmals im Überblick dargestellt (vgl. Tab. 9.1):

Tab. 9.1: Monomerbausteine der Testbibliothek

Fmoc-Aminosäuren der Testbibliothek			
D-Lys(Boc)OH	L-Lys(Boc)OH	D-Arg(Pmc)OH	D-PheOH
D-His(Trt)OH	D-LeuOH	L-Asn(Trt)OH	

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Konzept „one bead one compound“ verfolgt. Diese Methode bietet den Vorteil, daß die Identifizierung aktiver Moleküle mit sehr wenig Substanz –bereits eine Harzkugel reicht aus- möglich ist. Für den Einsatz im nachfolgenden Assay war es essentiell, ein Harz mit sehr guten Quelleigenschaften im wässrigen Medium zu finden. Die Wahl fiel deshalb auf das Amino-PEGA-Harz, in das Makromoleküle bis zu einer Größe von 35 kD hineindiffundieren können und daher für die Inkubation mit RNA ideale Voraussetzungen liefert. Im Rahmen einer „Split and combine“ Synthese erfolgte die Kodierung parallel zur Erstellung der Tripeptid-Bibliothek über halogenaromatische Reportermoleküle (Abb. 9.1; Tab. 9.2). Folgende Tags wurden bei der Synthese verwendet:



R = Cl oder H / n = 3; 5-12

Abb. 9.1: Struktur der Reportermoleküle

Tab. 9.2: Struktur der verwendeten Tags mit Abkürzung

Tag (Abk.)		
C ₁₀ Cl ₅ (T2)	C ₇ Cl ₅ (T9)	C ₈ Cl ₃ (2,4,6) (T17)
C ₁₁ Cl ₅ (T3)	C ₁₀ Cl ₃ (2,4,6) (T11)	C ₇ Cl ₃ (2,4,5) (T18)
C ₉ Cl ₅ (T4)	C ₆ Cl ₅ (T12)	C ₇ Cl ₃ (2,4,6) (T19)
C ₁₂ Cl ₃ (2,4,6) (T6)	C ₉ Cl ₃ (2,4,5) (T13)	C ₆ Cl ₃ (2,4,6) (T20)
C ₁₁ Cl ₃ (2,4,5) (T7)	C ₉ Cl ₃ (2,4,6) (T14)	C ₅ Cl ₃ (2,4,6) (T21)
C ₁₁ Cl ₃ (2,4,6) (T8)	C ₅ Cl ₅ (T15)	C ₃ Cl ₃ (2,4,6) (T22)

Die Kupplung der Tags an der festen Phase (2% der Oberfläche) erfolgte über den Säurerest. Zunächst wurde eine Tripeptid-Bibliothek nach der split and combine Methode hergestellt: Nach einzelner Kupplung der sieben Fmoc-Aminosäuren (DMF, 2 eq Aminosäure, DIC, HOBT) folgte die Entschützung und Einführung des ersten Tags (2% Tag, bezogen auf die Oberflächenbelegung, DMF, DIC, Kupplung über Nacht). Zur Prüfung auf vollständige Tagkupplung wurden ca. 10 Harzkugeln in ein GC-Einsatzgläschen überführt, mit 10 µl MeOH versetzt und 4 h bei 366 nm bestrahlt. Es kommt hierbei zu einer photolytischen Spaltung des Tags vom polymeren Träger nach folgendem Mechanismus (vgl. Abb. 9.2):

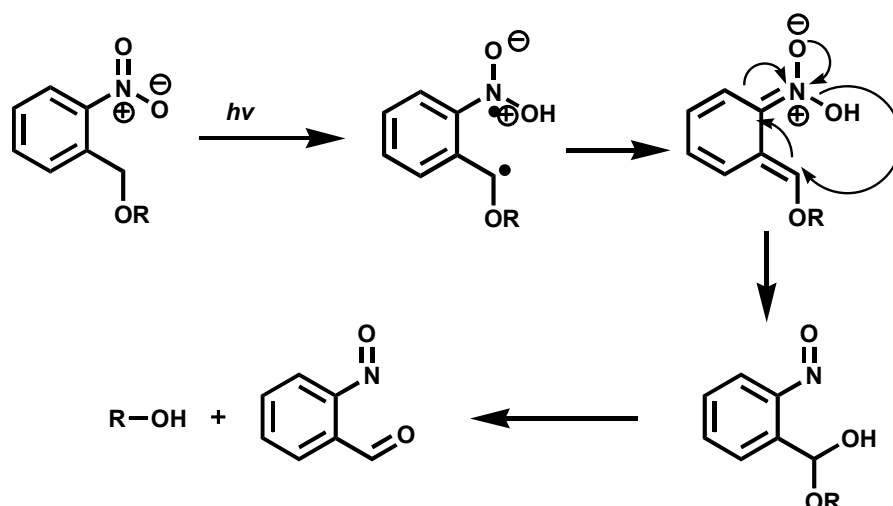


Abb. 9.2: Mechanismus der Abspaltung eines Tags bei UV-Bestrahlung

Die freigesetzten Alkohole wurden anschließend mittels GC analysiert. Nach erfolgreicher Kupplung wurden die Harzkugeln vereinigt, gemischt und wiederum in 7 gleiche Portionen aufgeteilt. Analog erfolgte die Kupplung der 2. und 3. Aminosäureposition sowie Kodierung. Zur Abspaltung der Schutzgruppen wurde die Bibliothek für 24 h mit TFA/TIS/ H_2O (95:2.5:2.5) behandelt. Nach ausgiebigem Waschen und Trocknen erfolgte die Inkubation der Bibliothek mit fluoreszenz-markierter TARwt-RNA (HIV-1) in TK-Puffer x1 (20 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.01% Triton X-100) über 16h. Tripeptide mit guten Bindungseigenschaften lagern dabei RNA an und fluoreszieren unter dem Fluoreszenz-Mikroskop (siehe Abb. 9.3).

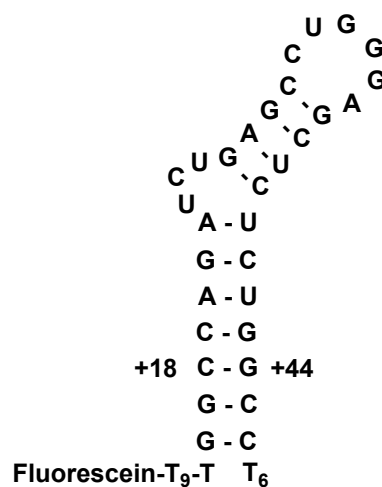
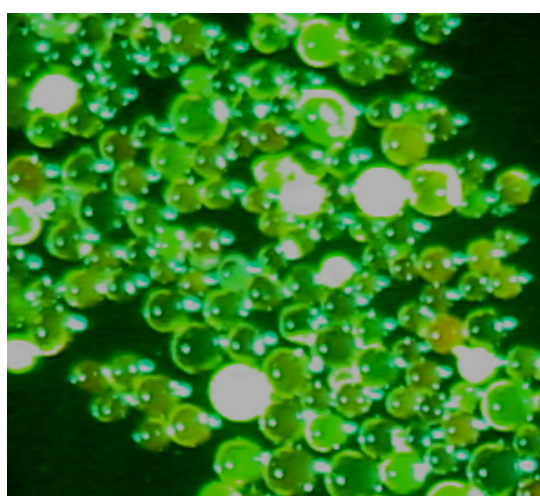


Abb. 9.3: TARwt- Inkubierte Harzkugeln unter dem Mikroskop und Struktur der TARwt-RNA

Hell leuchtende Harzkugeln wurden in GC-Einsatzgläschen separiert und bestrahlt. Bei der Analyse am GC ließen sich die Aminosäuren innerhalb der Tripeptidsequenz nur selten bestimmen. Deswegen wurden zunächst eine Reihe von Hypothesen aufgestellt.

- die Kupplung der Reportermoleküle ist nicht vollständig
- die Bestrahlungszeit ist zu kurz
- die Tags spalten bereits beim Selektieren unter dem Fluoreszenz- Mikroskop ab und lassen sich deshalb später nicht mehr detektieren
- Einfluß der Kettenlänge der Tags. Längerkettige Tags lösen sich nicht in MeOH und entziehen sich so der Messung
- der bei der Inkubation verwendete Puffer hat Einfluß auf die Abspaltung
- das zur Abspaltung verwendete Volumen an MeOH ist zu gering

Zu diesem Zweck erfolgte zunächst die Synthese eines Test-Harzes. An das Harz wurden drei verschiedene Tagmoleküle (T22, T17, T15) unter den oben beschriebenen Bedingungen gekuppelt. Nach Separierung und Bestrahlung (366 nm, 4h, 10 µl MeOH) konnte anhand der GC-Spektren eine eindeutige Zuweisung der Tags vorgenommen werden. Eine Verlängerung der Bestrahlungszeit (über Nacht) führte nur zur Bildung von Nebenprodukten. Damit konnte gezeigt werden, dass das Volumen des Lösungsmittels bzw. die Konzentration der Alkohole zur Detektion ausreicht. Um den möglichen Einfluß des Fluoreszenz-Mikroskops zu untersuchen, wurde ein Teil der Harzkugeln eine halbe Stunde mit der Quecksilberleuchte des Mikroskops bestrahlt und ausgelesen, ein anderer Teil wurde unter einer Standard-Schreibtischlampe isoliert. Es bestätigte sich dabei, daß die Fluoreszenzlampe keinen Einfluß auf das Harz hat, da die Sequenzen eindeutig zugeordnet werden konnten. Um den Einfluß der Kettenlänge der abgespaltenen Alkohole zu untersuchen wurden die längerkettigen Tagmoleküle T5, T6 und T8 an das Harz gekuppelt. Auch diese liessen sich anhand des GC eindeutig nachweisen. Der Austausch des Lösungsmittels MeOH gegen Dimethylformamid hingegen zeigte ein Signal, das sich mit einem Tagsignal überlagerte. Im weiteren wurde der Effekt des TK-Puffers untersucht. Das Harz wurde mit TK-Puffer x1 (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 20 mM KCl, 0,01% Triton x –100) versetzt und vier Tage bei Raumtemperatur behandelt. Sowohl

die Retentionszeiten der Reportermoleküle T5/6/8 als auch T22/17/15 ließen sich eindeutig am Gaschromatographen nachweisen. Bei allen Testläufen war jedoch die teilweise geringe und unterschiedliche Intensität der GC-Signale auffallend. Diese war vor allem bei der Testkupplung des Harzes mit T5/6/8 prägnant. Zur Kontrolle des vollständigen Taggings der Bibliothek waren jeweils mehrere Kugeln entnommen und bestrahlt worden. Es war aufgrund dieser Untersuchungen zu vermuten, dass es sich um ein chemisches, jedoch nicht reproduzierbares Problem bei der Kupplung der Reportermoleküle handelt. Der Einsatz anderer Kupplungsbedingungen, wie die Verwendung von DMAP oder HATU brachte ebenfalls keine Verbesserung. Da bei der Synthese unterschiedliche Chargen an DMF benutzt wurden, lag der Verdacht nahe, dass Spuren von Dimethylamin zu einer unvollständigen Kupplung der Tagmoleküle geführt haben könnte. Zu diesem Zweck wurde nochmals die Kupplung der Tags 22/15/17 vorgenommen, wobei NMP als Lösungsmittel gewählt wurde. Die Signalintensitäten der Reportermoleküle ließen sich dadurch um ein Vielfaches steigern und führten somit zu optimierten Kupplungsbedingungen. Da zur Kupplung nur geringe Mengen der Tags eingesetzt wurden, wirkte sich das im DMF in Spuren vorhandene Dimethylamin merklich aus. Durch die Reaktion der Tags mit dem sekundären Amin konnten sie sich somit der Kupplung an der festen Phase entziehen, was eine unvollständige Kupplung zur Folge hatte. Nach Optimierung dieser Kupplungsbedingungen erfolgte der Einstieg in die Synthese der ersten 4096 Tripeptide umfassenden Bibliothek (im weiteren Verlauf als 4096er Bibliothek (I) bezeichnet). Neben den bereits vorgestellten neuen Aminosäuren, wurde die Bibliothek durch weitere vier synthetische Aminosäuren erweitert.^[128] Zusammen mit den eingesetzten kommerziellen Aminosäuren bestand diese Bibliothek aus insgesamt 16 Bausteinen. Auf den Einsatz der Aminosäure Tryptophan wurde im Rahmen dieser Synthese verzichtet, da sich die Herstellung des Derivates D-Arg-D-Trp-D-Arg nicht immer reproduzieren ließ. Eine Übersicht der verwendeten Aminosäuren ist in Abb. 9.4 und Tabelle 9.3 dargestellt:

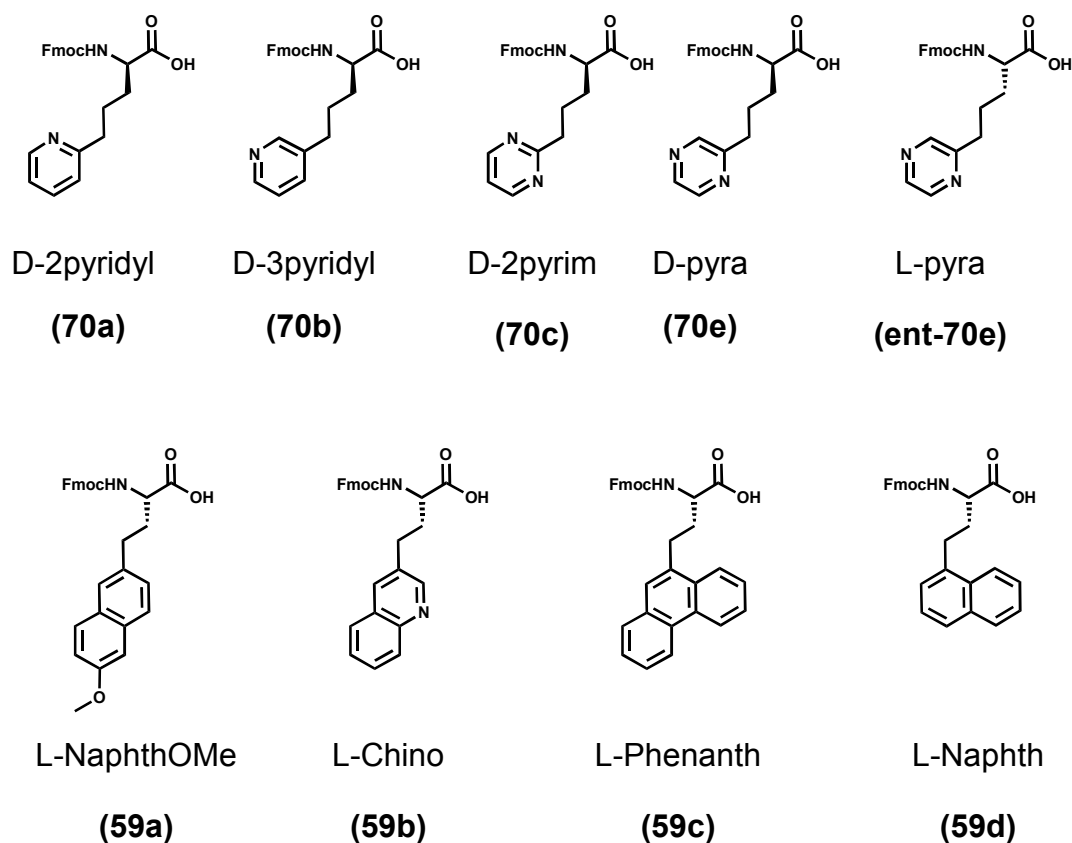


Abb. 9.4: Nicht-natürliche Bausteine der 4096er Bibliothek (I)

Tab. 9.3: Monomerbausteine aus Standard-Aminosäuren

Standard Fmoc-Aminosäuren der 4096er Bibliothek(I)			
D-Lys(Boc)OH	L-Lys(Boc)OH	D-Arg(Pmc)OH	D-PheOH
D-His(Trt)OH	D-LeuOH	L-Asn(Trt)OH	

Die Synthese der 4096er Tripeptid-Bibliothek (I) erfolgte analog zu der oben beschriebenen Methode. Bei der Kupplung der einzelnen Reportermoleküle wurde jedoch das Lösungsmittel DMF durch NMP ersetzt. Zur Kontrolle der jeweiligen Tag-Markierung wurden jeweils 3 Harzkugeln unter dem Mikroskop isoliert und einzeln in ein GC-Einsatzgläschen überführt. Nach Zugabe von 10 µl MeOH und 4 h Bestrahlung bei 366 nm wurde die Lösung mit dem GC/ECD vermessen.

Um den Einfluß der Seitenkette bei der Bindung an RNA zu erhöhen, wurde die Bibliothek abschließend am N-terminalen Ende acetyliert. Die Abspaltung der Schutzgruppen erfolgte analog der oben beschriebenen Methode.

Die 4096er Bibliothek (I) stand somit für die ersten Inkubationen bereit. Hierfür wurden jeweils 10 mg des Harzes mit TAR-RNA*fl*, ψ -RNA*fl* und Bcr-Abl-*mRNAfl* inkubiert, wobei ein Verhältnis von Tripeptid-Harz zu RNA von 7000:1 gewählt wurde. Die Inkubation erfolgte über Nacht. Die ausgelesenen Tripeptid-Sequenzen sind im nachfolgenden Kapitel dargestellt.

9.3 Inkubation der 4096er Bibliothek (I) mit TAR*wt*-RNA*fl*

Als fluoreszenzmarkierte TAR*wt*-RNA wurde folgende Sequenz verwendet (vgl. Abb. 9.5):

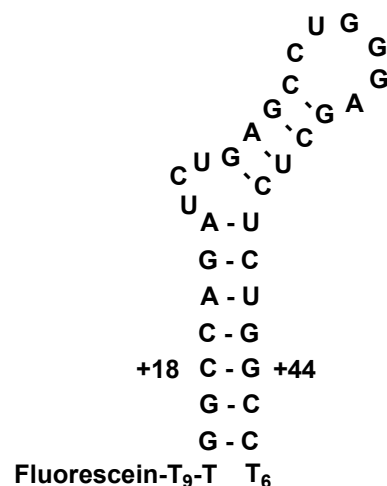



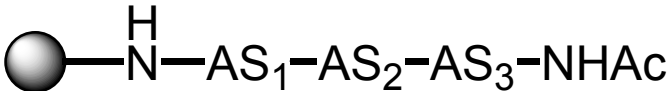
Abb. 9.5: Struktur der fluoreszenz-markierten TAR*wt*-RNA (HIV-1)

Trotz der erfolgreichen Tagkontrolle während der Synthese, war die Detektion der Reportermoleküle nach der Inkubation mit TAR*wt*-RNA*fl* noch nicht ideal. Ein häufig auftretendes Problem war, daß bestimmte Positionen nicht zweifelsfrei ausgelesen werden konnten. Über GC-Detektion wurden folgende Tripeptid-Sequenzen identifiziert (Tab. 9.4).

Tab. 9.4: Inkubation der 4096er Bibliothek (I) mit TARwt-RNAfl

 $\text{H}-\text{N}-\text{AS}_1-\text{AS}_2-\text{AS}_3-\text{NHAc}$		
D-2pyrim	D-Leu	L-Phenanth
D-Arg	L-NaphthOMe	D-pyrazinyl
L-Naphth	L-Naphth	D-Arg
D-His	L-Lys	D-3pyridyl
L-Lys	D-Lys	L-Phenanth
D-His	L-Naphth	D-Arg
D-2pyrim	D-Lys	L-Phenanth
D-Lys	L-pyrazinyl	D-3pyridyl
D-3pyridyl	L-Naphth	L-Naphth
D-2pyrim	D-Lys	L-Lys 75% D-Arg 25%
x	D-2pyridyl	D-3pyridyl
D-Asn	D-2pyrim	L-Phen (50%) D-3pyridyl (50%)
D-Arg	x	D-His
x	L-pyrazinyl	L-Asn
x	L-pyrazinyl	D-2pyrim
x	L-Asn	L-Phen
L-Phenanth	L-Asn	x
x	D-Lys	L-pyrazinyl

eine Position
nicht eindeutig

		
x	x	D-Arg
D-Arg	x	x
x	x	D-3pyridyl
x	x	L-Phenanth
x	L-Naphth	x
x	L-Naphth	x
x	D-2pyridyl	x
x	L-Asn	x

zwei Positionen
nicht eindeutig

Auch bei der Inkubation mit fluoreszenz-markierter ψ -RNA und Bcr-Abl-*m*RNA konnte nur eine begrenzte Anzahl der aufgefallenen Tripeptid-Sequenzen zweifelsfrei bestimmt werden. Auf eine Interpretation der Ergebnisse wird daher an dieser Stelle verzichtet. Vielmehr sollten die Erfahrungen aus der ersten Synthese für die Herstellung einer zweiten Bibliothek genutzt werden. Ein verbessertes Tagschema sollte hierbei eine eindeutige Identifizierung der Sequenzen ermöglichen.

9.4 Herstellung einer zweiten 4096er Bibliothek (II) mit verbessertem Tagschema

Da bei der vorangegangenen Bibliothek nur ein Teil der ausgelesenen Kugeln eindeutig identifiziert werden konnte, erfolgte die Synthese einer zweiten Tripeptidbibliothek (vgl. Abb. 9.3 und Tab 9.4). Hierfür wurden die gleichen Aminosäuren wie zuvor eingesetzt, jedoch ein neues Tagschema verwendet. In der vorangegangenen Bibliothek wurde, wo möglich, auf eine Doppelkodierung verzichtet. In diesem Fall wurden die synthetischen Aminosäuren mit zwei Reportermolekülen markiert. Die Auswertung der Spektren wurde in der vorangegangenen Bibliothek teilweise durch Artefakte erschwert. Diese können durch das Lösungsmittel, aber auch synthesebedingt in die GC-Probe eingeschleppt worden sein. Liegen diese Signale nahe der Retentionszeit der Reportermoleküle, ist eine zweifelsfreie Identifizierung der Sequenz nicht möglich. Aus der vorangegangenen Bibliothek waren die Retentions-

zeiten der Artefakte bekannt. Durch Doppelkodierung, bzw. Ausschluß bestimmter Tagmoleküle bei der Auswahl der Tags für die zweite Bibliothek konnte die Störung durch Artefakte weitestgehend verhindert werden. Das entsprechende Kodierungsschema ist im experimentellen Teil dargestellt. Die Synthese und Inkubation der Bibliothek erfolgte analog zur oben beschriebenen Vorgehensweise. Hierbei konnten durch das neue Tagmuster bedeutend mehr Sequenzen identifiziert werden. Um einen Einblick über die Selektivität der Tripeptide bei der RNA-Bindung zu bekommen, wurde zusätzlich mit TAR-Mutanten inkubiert. Hierbei sollte durch Einsatz von *TARloopless* und *TARbulgeless* geklärt werden, ob die Identifizierung von Loop- und Bulge-Liganden möglich ist. Um die Funktion der basischen Seitenketten zu begünstigen, wurde für die weiteren Inkubationen acetyliertes Bibliotheksharz verwendet.

Zu Beginn der Inkubationen stellten sich folgende Fragen:

- Ist die Identifizierung von Liganden bei Inkubation mit TAR*w^t* möglich?
- Gibt es Beeinflussung durch den T10 Linker?
- Kann zwischen Loop- und Bulgebindern unterschieden werden?
- Gibt es weitere Methoden, um zwischen Bulge- und Loopbindern zu unterscheiden?
- Kann die Bindung von Liganden durch die Variation des wäßrigen Mediums verändert werden?
- Kann der beste Ligand ermittelt werden?

Zur Untersuchung dieser Fragestellungen erfolgte die Inkubation der 4096er Bibliothek (II) unter den folgenden Bedingungen. Die in den einzelnen Tabellen optisch hervorgehobenen Tripeptide wurden neu über Festphasensynthese hergestellt. Als Tripeptide wurden hierbei Sequenzen herausgegriffen, deren Aminosäuren auch statistisch sehr dominant auftraten. Anhand von *in vitro* Untersuchungen wurde ein Vergleich der verschiedenen Tripeptide anhand der IC₅₀-Werte angestellt. Diese Ergebnisse sind abschließend dargestellt (Tab. 9.17).

9.5 Inkubation der 4096er Bibliothek (II) mit TARwtfl

Für die Inkubationen wurden jeweils wieder 10 mg acetyliertes Harz verwendet und in Gegenwart von TK-Puffer x1 (siehe oben) mit fluoreszenz markierter RNA im Verhältnis von 7000:1 versetzt. Es konnten folgende Sequenzen vollständig isoliert und identifiziert werden (vgl. Tab. 9.5), die in Abb. 9.6 nach statistischer Verteilung dargestellt sind:

Tab. 9.5: Identifizierte Tripeptid-Sequenzen aus der 4096er Bibliothek (II) nach Inkubation mit TARwt-RNA

Selektierte Tripeptide (C→NHAc) bei Inkubation mit TARwt	
D-pyrazinyl-D-2pyridyl-D-2pyrim	D-2pyrim-D-Phe-D-2pyridyl
D-Asn-D-2pyrim-D-2pyridyl	L-Naphth-L-Phenanth-L-Lys
Naphthyl-D-2pyridyl-Naphthyl	L-Asn-D-2pyrim-D-2pyridyl
D-pyrazinyl-D-Phe-NaphthOMe	D-3pyridyl-L-Asn-L-Naphth
D-Arg-D-2pyridyl-L-Chino	D-2pyridyl-L-pyrazinyl-D-Asn
D-2pyridyl-L-pyrazinyl-D-Asn	L-pyrazinyl-D-Phe-D-2pyridyl
D-2pyridyl-D-2pyridyl-D-2pyrim*	L-pyrazinyl-D-2pyridyl-L-Chino
D-Leu-D-2pyridyl-D-2pyrim	D-2pyridyl-D-pyrazinyl-L-pyrazinyl
L-Naphth-D-2pyrim-D-2pyridyl	D-His-D-2pyridyl-D-2pyrim
D-2pyrim-D-2pyridyl-D-2pyridyl	D-Phe-D-2pyrim-D-2pyridyl*
D-pyrazinyl- D-3pyridyl-NaphthOMe	L-Lys-D-Phe-D-2pyridyl
D-2pyridyl-L-Naphth-D-2pyridyl	D-Phe-L-Naphth-L-Lys
D-Arg-D-2pyridyl-L-Chino	L-Asn-D-pyrazinyl-D-2pyridyl
D-Phe-L-pyrazinyl-L-Asn	L-Naphth-L-pyrazinyl-L-pyrazinyl
L-Lys-D-2pyrim-L-Asn	L-Asn-D-pyrazinyl-D-pyrazinyl
D-His-L-pyra-D-2pyrim	D-2pyridyl-L-Asn-L-Asn
L-pyra-D-Phe-L-Lys	L-Chino-D-His-D-Leu
D-2pyridyl-L-pyrazinyl-L-Lys	D-3pyridyl-D-Phe-L-Lys
D-pyrazinyl-D-Leu-L-pyrazinyl	

*hervorgehobene Tripeptide wurden neu synthetisiert und im *in vitro*

Assay auf ihre Bindungseigenschaften vermessen

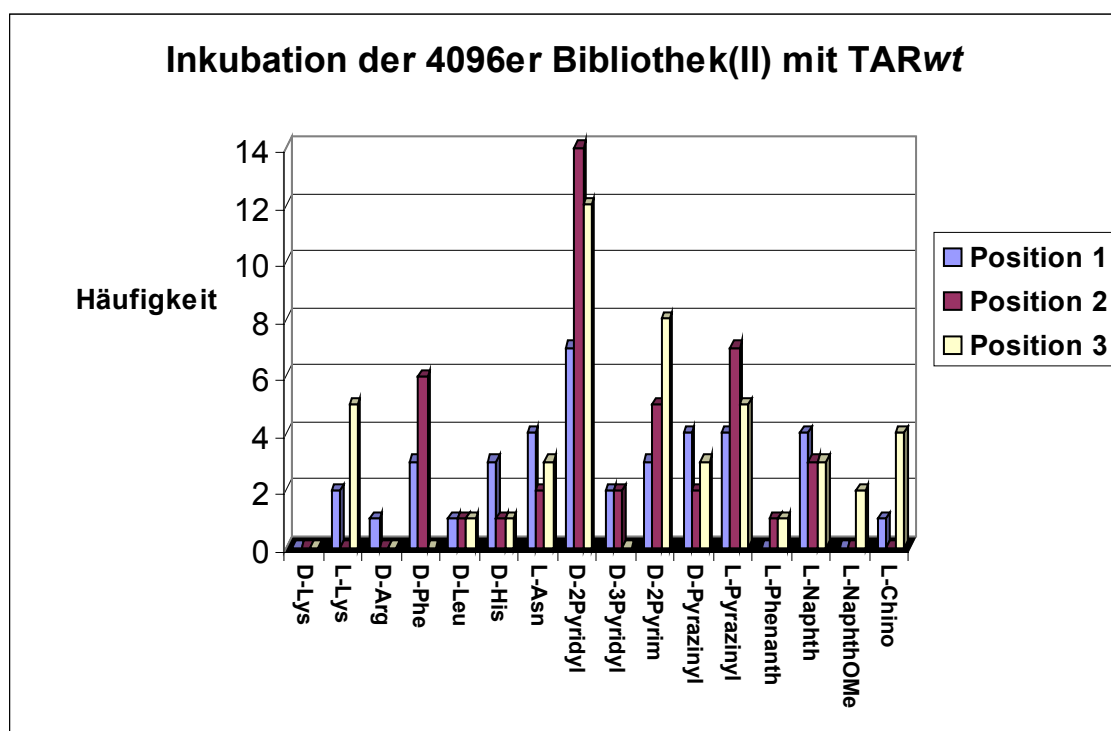


Abb. 9.6: Statistische Verteilung der Aminosäuren pro Position

Beim Vergleich der verschiedenen Sequenzen fällt vor allem die Aminosäure D-2pyridyl auf. Auf allen drei Positionen ist diese Aminosäure am häufigsten vertreten. Für die zweite Position sind auch L-pyrazinyl und D-Phe häufig anzutreffen. Die dritte Position wird nach der Aminosäure D-2pyridyl vor allem durch D-2pyrim besetzt. Sehr bemerkenswert ist, daß die Aminosäuren mit basischen Seitenketten nur sehr selten vertreten sind. Während D-Lys überhaupt nicht und D-Arg nur ein einziges Mal identifiziert werden konnte, zeigte sich bei diesem Versuch eine Präferenz für die nicht-natürlichen heterocyclischen Aminosäuren. Anhand der Beispiele D-2pyridyl und D-3pyridyl wird deutlich, wie entscheidend das Substitutionsmuster des Heterocyclus ist. Während D-2pyridyl auf jeder Aminosäureposition extrem häufig vertreten war, zeigte D-3pyridyl nur sehr schwache Affinität zur TAR-RNA. Auch die Konfiguration der Tripeptide hat einen entscheidenden Einfluß auf die Bindungseigenschaft. Während innerhalb der Sequenzen D-Lys überhaupt nicht isoliert werden konnte, war L-Lys für die Positionen 1 und 3 oft vertreten.

Diese Inkubation lieferte jedoch keine Aussagen darüber, ob es sich bei den identifizierten Tripeptiden um Bulge oder Loop-Binder handelt. Auch eine Bindung an den T10-Linker ließ sich nicht ausschließen.

9.6 Inkubation der 4096er Bibliothek (II) mit T10-Fluorescein

Um einen möglichen Einfluß des T10-Linkers zu untersuchen, erfolgte die Inkubation der Bibliothek mit einem fluoreszenz-markierten T10 Linker. Die Inkubation erfolgte wiederum analog zu den bekannten Bedingungen. Hierbei konnten keine leuchtenden Harzkugeln detektiert werden. Ein Einfluß des T10-Linkers auf die Bindung der Tripeptid-Bibliothek läßt sich somit ausschließen.

9.7 Inkubation der 4096er Bibliothek (II) mit TARbulgeless

Zur Identifizierung potentieller Loop-Liganden wurde eine Inkubation mit einer TARbulgeless Mutante durchgeführt. Die Struktur dieser RNA ist in Abb. 9.7 dargestellt.

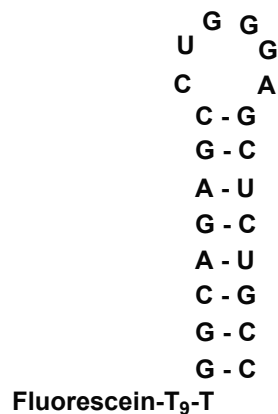


Abb. 9.7: Struktur der Fluorescein-markierten TAR-Bulgeless-Mutante

Die Inkubation der Bibliothek erfolgte analog zur oben beschriebenen Methode. Eine komplette Auflistung aller isolierten Sequenzen ist im experimentellen Teil ausführlich dargestellt. An dieser Stelle erfolgt die Auflistung der Tripeptid-Sequenzen, die vollständig bestimmt werden konnten (vgl. Tab.9.6).

Tab. 9.6: Identifizierte Sequenzen der Tripeptide aus der 4096er Bibliothek (II) nach Inkubation mit TARbl

Selektierte Tripeptide (C→NHAc) bei Inkubation mit TARbl	
L-Asn-D-2pyridyl-D-2pyrim	D-2pyrim-D-His-D-2pyrim
D-2pyrim-D-2pyridyl-D-2pyridyl	L-Asn-D-2pyrim-D-2pyridyl*
D-Leu-D-2pyridyl-D-2pyrim	D-Pyrazinyl-D-Lys-L-Phenanth
L-Lys-D-3pyridyl-D-Arg	D-Phe-L-Pyrazinyl-L-His
L-Lys-D-Pyrazinyl-D-2pyridyl	D-2pyridyl-D-3pyridyl-D-Arg*

*hervorgehobene Tripeptide wurden neu synthetisiert und im *in vitro*

Assay auf ihre Bindungseigenschaften vermessen

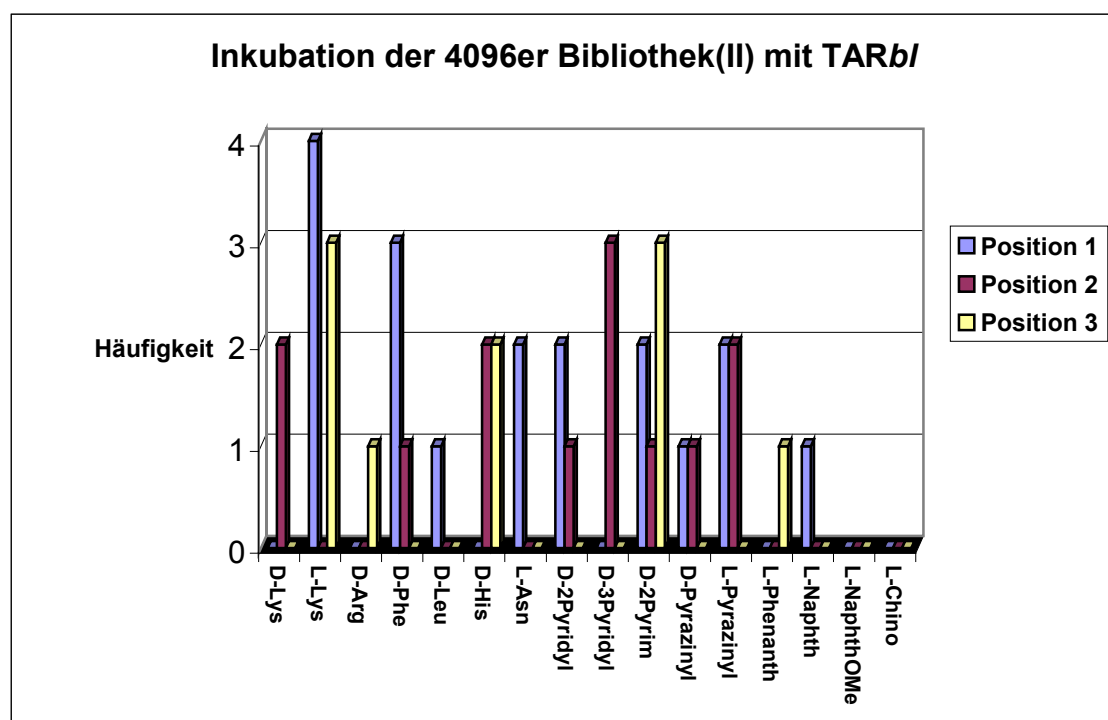


Abb. 9.8: Statistische Verteilung der Aminosäuren bei der Inkubation mit TARbl-Mutante

Aus der Graphik (Abb. 9.8) wird deutlich, daß bei der Inkubation der Bibliothek mit TARbl der Anteil an identifizierten Aminosäuren mit basischen Seitenketten ansteigt. Die Aminosäure D-2pyridyl ist in diesem Fall eher unterrepräsentiert. Die erste Position wird hier durch L-Lys, gefolgt von D-Phe dominiert. Während bei der Inkubation mit TARwt die Aminosäure D-3pyridyl eher unterrepräsentiert war, zeigte sich für die zweite Position eine Präferenz für diese Aminosäure. In der dritten

Position sind vor allem L-Lys und D-2pyrim identifiziert worden. Anteilmäßig stieg auch die Aminosäure D-His in der Häufigkeit an. Sehr auffallend ist die Abwesenheit der Aminosäuren L-NaphthOMe und L-Chino. Auch in diesem Beispiel läßt sich der Einfluß der Konfiguration der Aminosäuren zeigen. L-Lys ist wie bei der Inkubation mit TARwt sehr viel stärker vertreten als D-Lys und auch beim Pyrazinyl-Derivat ist die L-konfigurierte Aminosäure um den Faktor zwei gegenüber der D-Konfiguration bevorzugt.

9.8 Inkubationen mit der TAR/loopless Mutante

Zur Identifizierung potentieller Loop-Binder wurde folgende TAR/*loop*/ess-Mutante eingesetzt (vgl. Abb. 9.9):

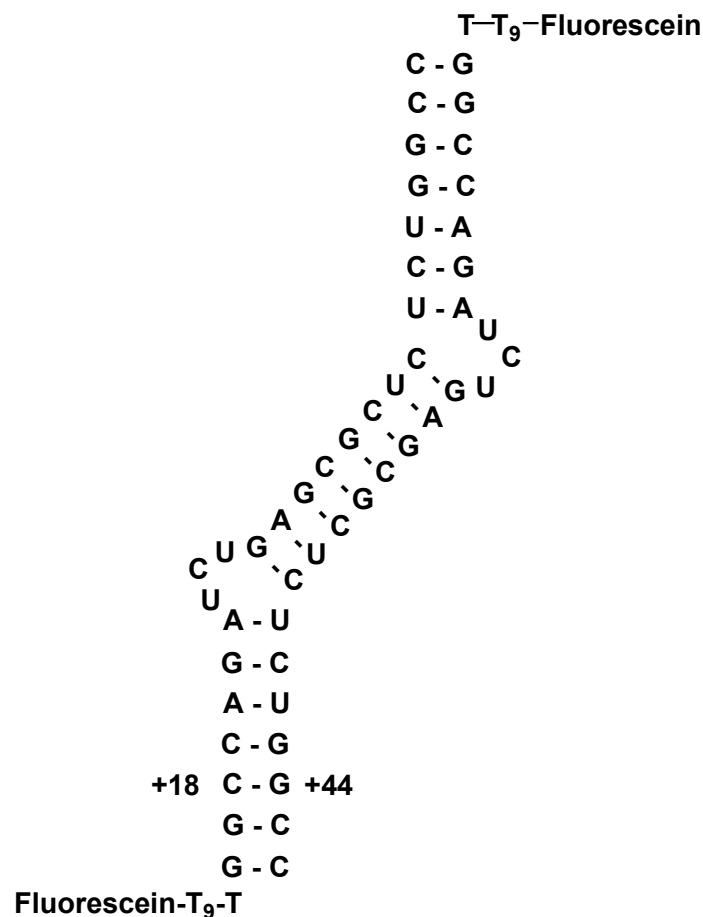


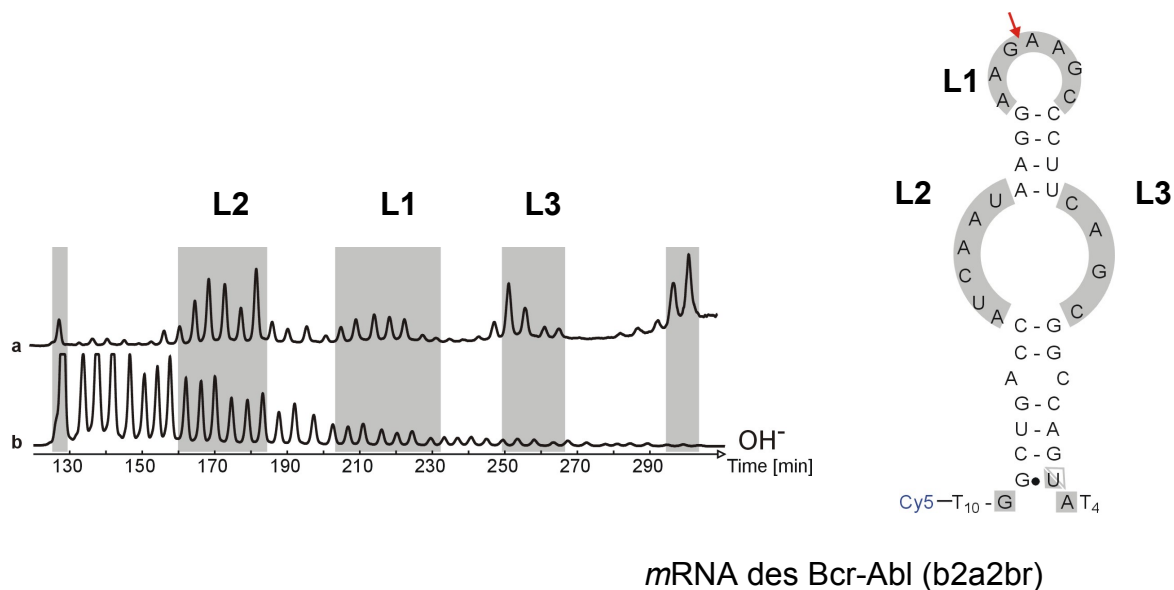
Abb. 9.9: Struktur der TARloopless-RNA

Die Inkubation der Bibliothek erfolgte unter den bekannten Bedingungen. Es ließen sich jedoch nur wenige Tripeptid-Sequenzen isolieren. Diese enthielten vor allem

Histidin-reiche Sequenzen, die sich bei der Inkubation mit TAR*bulgeless* als Loop-Binder ausgezeichnet hatten. Sie enthielten jedoch Strukturen, die bereits zuvor als Loop-Liganden isoliert wurden. Es lag die Vermutung nahe, daß die loopless Mutante möglicherweise nicht in der erwarteten Sekundärstruktur vorlag. Um die wertvollen Ressourcen zu sparen, wurde die Ligandensuche zunächst auf weitere Zielstrukturen ausgedehnt und gleichzeitig die Synthese einer weiteren, aus kommerziellen Standard-Aminosäuren bestehenden, Bibliothek aufgenommen. Hiermit sollten die Inkubationsbedingungen zur Identifizierung von Bulge-Liganden weiter optimiert werden und die Variation der Reaktionsbedingungen untersucht werden.

9.9 Ausweitung der Ligandensuche auf weitere Zielstrukturen

Nachdem bei den Inkubationen mit TAR*wild* und Mutanten erfolgreich diverse Liganden selektiert werden konnten, sollte die Suche nach potentiellen RNA-Bindern auf weitere Zielstrukturen ausgedehnt werden. Neben der ψ -RNA (stemloop 3) des HIV-1 wurde eine Teilstruktur der mRNA des Bcr-Abl Proteins (b2a2br) ausgewählt. Während für die ψ -RNA bereits eine definierte Struktur bekannt war, existierten für die mRNA des Bcr-Abl Proteins keine Angaben über eine Sekundärstruktur.^[130] Eine Methode zur Strukturaufklärung konnte erfolgreich von Frau Dr. U. Scheffer etabliert werden. Durch ein Sekundärstruktur-Mapping mit einer künstlichen Nuklease kann eine Zuordnung der RNA-Struktur vorgenommen werden. Die Effizienz dieser Methode wurde zunächst anhand der bekannten TAR*wild*-RNA bestätigt. Die Nuklease zeigte hierbei in den ungepaarten Loop-Bereichen eine Spaltaktivität, wohingegen der Stemloop-Bereich erwartungsgemäß intakt blieb. Diese Methode konnte somit einen Beitrag zur Aufklärung der Struktur eines Bereichs der mRNA des Bcr-Abl Proteins (b2a2br) leisten. Die Behandlung der mRNA mit der künstlichen Nuklease ergab das in Abb. 9.10 dargestellte Elektropherogramm, zum Vergleich ist die basische Hydrolyse abgebildet. Zur Strukturbestimmung wurde Cy5-markierte RNA verwendet. In den anschließenden Inkubationen der Bibliothek wurde Fluorescein-markierte RNA eingesetzt.



*Abb. 9.10: Strukturaufklärung der *mRNA* des Bcr-Abl-Proteins mittels Sekundärstruktur-Mapping – a) Spaltung der ungepaarten Basenregionen durch eine künstliche Nuklease, b) basische Hydrolyse; rechts im Bild: Darstellung der Bcr-Abl-*mRNA*, der Translokationsbruchpunkt ist mit einem Pfeil markiert*

Die *mRNA* des Bcr-Abl Proteins weist zwei Loop-Regionen auf (vgl. Abb. 9.10). Bereits in der 4096er Bibliothek (I) konnten einige Liganden mit Affinität zur Bcr-Abl-*mRNA* Sequenzen isoliert werden. Da jedoch, wie bereits erwähnt, sowohl Artefakte, als auch nicht vollständig auszuwertende Sequenzen die Anzahl der aufgefallenen Tripeptide extrem limitierte, sollen an dieser Stelle nur die Ergebnisse mit der optimierten 4096er Bibliothek (II) vorgestellt werden.

9.10 Inkubation der 4096er Bibliothek (II) mit Bcr-Abl-*mRNA*

Nach der erfolgreichen Strukturbestimmung der *mRNA* des Bcr-Abl Proteins erfolgte die Inkubation der 4096er Bibliothek (II) analog zur beschriebenen Methode. Zur Inkubation wurde die in Abb. 9.10 dargestellte, jedoch Fluorescein-markierte RNA verwendet. Nach Isolierung der Liganden unter dem Fluoreszenzmikroskop und anschließender Identifizierung über das GC wurden folgende Tripeptidsequenzen erhalten (Tab. 9.7):

Tab. 9.7: Identifizierte Sequenzen aus der 4096er Bibliothek (II) nach Inkubation mit der mRNA des Bcr-Abl Proteins

Selektierte Tripeptide (C→NHAc) bei Inkubation mit Bcr-Abl-mRNA	
D-3pyridyl-L-Naphth-D-2pyridyl	D-3pyridyl-D-2pyridyl-D-Arg
D-Pyrazinyl-L-Chino-D-2pyrim	D-2pyrim-L-Pyrazinyl-D-2pyridyl
D-His-D-2pyridyl-L-Phenanth	L-Lys-L-Pyrazinyl-D-2pyridyl
D-2pyrim-D-Leu-D-2pyridyl	D-His-D-2pyridyl-L-Pyrazinyl
D-2pyridyl-D-Pyrazinyl-L-Asn	L-Asn-D2pyridyl-D-2pyridyl
L-Naphth-L-NaphthOMe-D-2pyridyl	L-Asn-D-His-L-Chino
L-Lys-D-3pyridyl-D-Leu	L-Lys-D-His-L-Chino
L-Asn-D-Phe-L-Pyrazinyl	D-3pyridyl-D-Phe-D-Arg

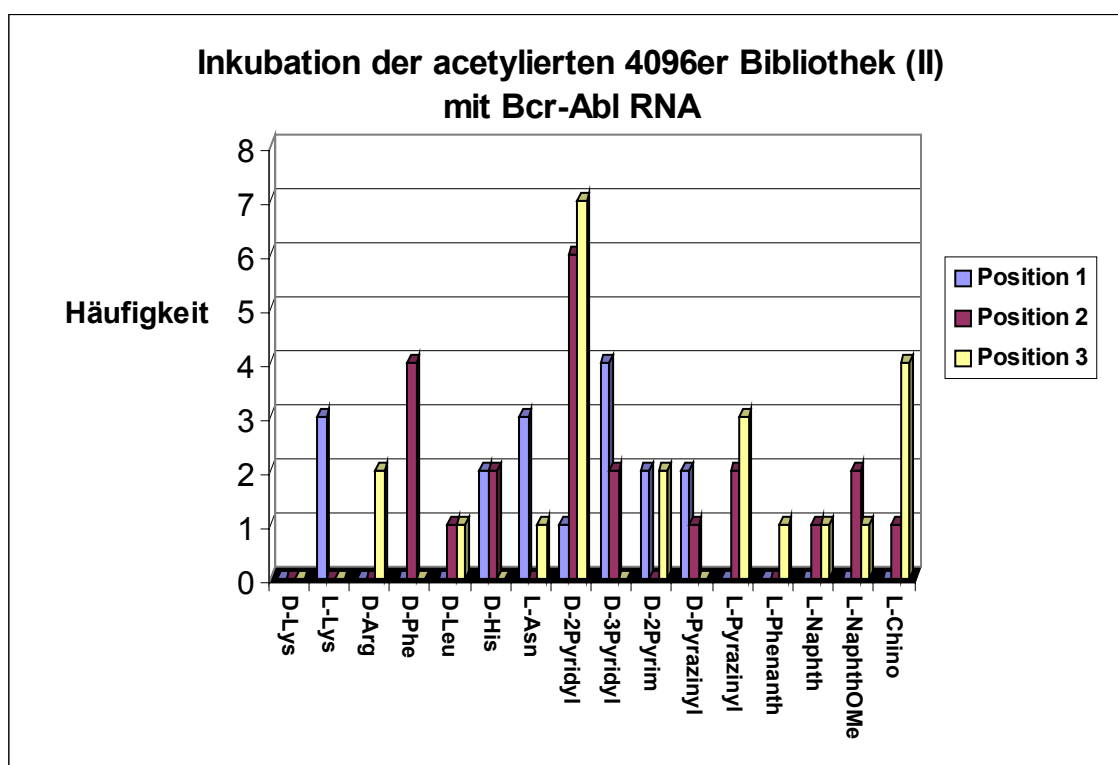


Abb. 9.11: Statistische Verteilung der Aminosäuren pro Position bei Inkubation mit mRNA des Bcr-Abl-Proteins

Anhand der Grafik (Abb. 9.11) wird ersichtlich, daß die erste Position vor allem durch D-3pyridyl, L-Lys und L-Asn dominiert wird. Der Vergleich der Inkubationen mit

TAR*wt* und TAR*bl* deutet darauf hin, daß D-3pyridyl sehr viel eher an Loop-Strukturen bindet. Die zweite und dritte Position sind wiederum eindeutig von der Aminosäure D-2pyridyl dominiert. Auch D-Phe (2. Position) und in diesem Fall auch L-Chino (3. Position) zeigten gute Bindungseigenschaften. Es wird deutlich, daß abgesehen von der ersten Position, vor allem die heterocyclischen Aminosäuren hohe Affinität zur Bcr-Abl mRNA zeigen.

9.11 Inkubation der 4096er Bibliothek (I) mit ψ -RNA

Eine Erweiterung der RNA-Ligandensuche wurde durch die Inkubation der Bibliothek mit der ψ -RNA (stemloop 3) des HIV-1 erreicht. Die ψ -RNA des HIV-1 ist maßgeblich für Verpacken des Virus verantwortlich (vgl. Kapitel HIV) und weist 4 verschiedene Stem-loop-Einheiten auf. Innerhalb dieser Region ist die Wechselwirkung der SL3 mit dem Gag-Protein ein Schlüsselschritt für das Verpacken des Virus. Sie wurde daher als ein weiteres Target eingesetzt. Die Struktur der ψ -RNA ist in Abb. 9.12 abgebildet.

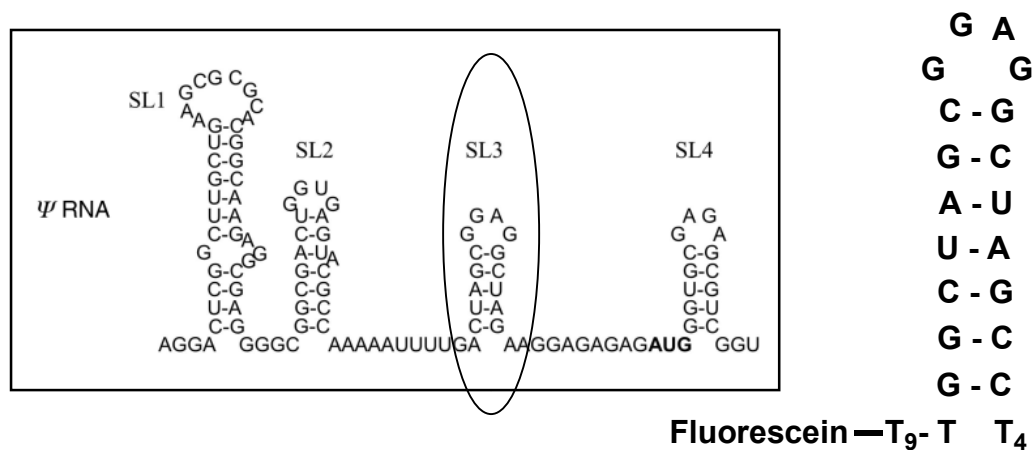


Abb. 9.12: Sekundärstruktur der fluoreszenzmarkierten ψ -RNA (SL3)

Nach Inkubation unter den beschriebenen Bedingungen konnten folgende Sequenzen isoliert werden (Tab. 9.8):

Tab. 9.8: Identifizierte Sequenzen der 4096er Bibliothek (II) nach Inkubation mit ψ -RNA

Selektierte Tripeptide (C→NHAc) bei Inkubation mit ψ -RNA	
D-Lys-L-Pyrazinyl-L-Asn	L-Asn-D-Pyrazinyl-D-Arg
D-3pyridyl-D-2pyridyl-L-Chino	L-Pyrazinyl-D-2pyridyl-L-Pyrazinyl
L-Asn-D-2pyridyl-D-2pyridyl	D-2pyridyl-L-Chino-D-Phe
D-2pyridyl-D-2pyridyl-L-Naphth	L-Pyrazinyl-L-Naphth-L-Naphth
D-Pyrazinyl-D-2pyridyl-L-Naphth	L-Lys-D-2pyridyl-L-Chino
L-Asn-D-Pyrazinyl-L-Asn	D-2pyrim-L-Asn-D-Pyrazinyl
D-His-D-Pyrazinyl-L-Chino	D-2pyrim-D-His-D-Phe
D-His-D-Pyrazinyl-L-Asn	

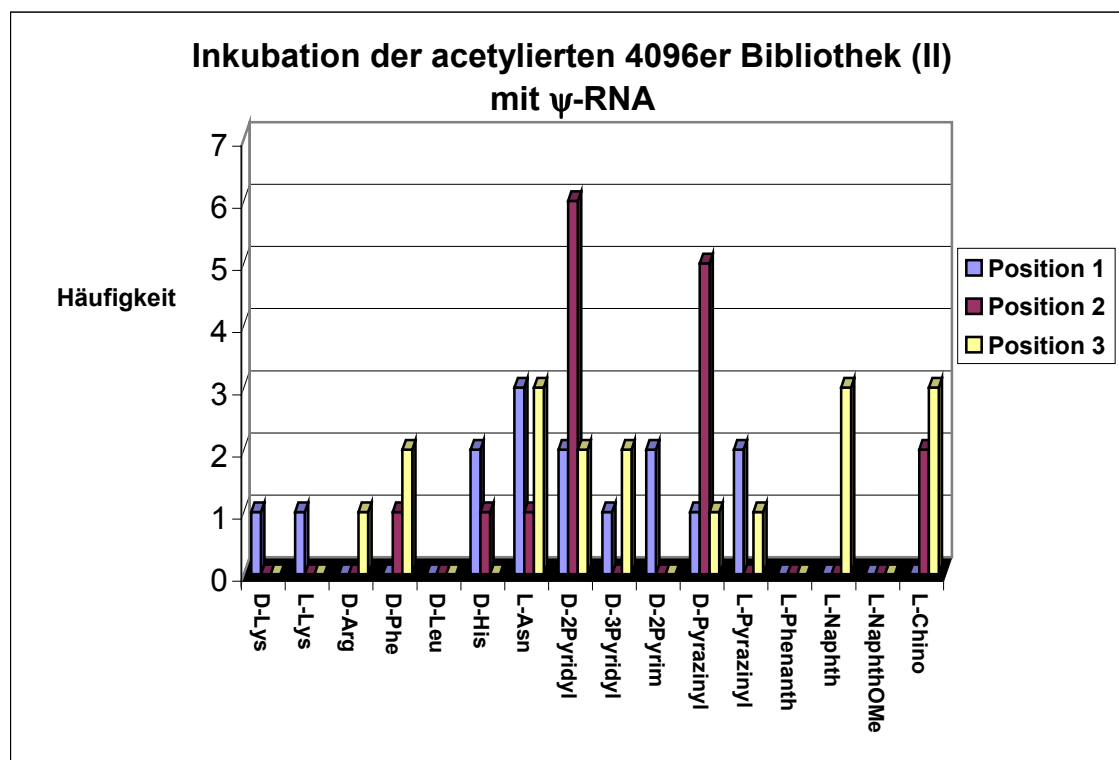


Abb. 9.13: Statistische Verteilung der Aminosäuren pro Position bei Inkubation mit ψ -RNA (stemloop 3) des HIV-1

Bei der Inkubation mit ψ -RNA zeigte sich, daß die erste und dritte Position vor allem durch L-Asn besetzt ist (vgl. Abb. 9.13). Eine herausragende Affinität zur ψ -RNA zeigte D-2pyridyl, welches neben D-pyrazinyl eindeutige Präferenz in der zweiten Position aufwies. Die dritte Position war neben L-Asn diesmal auch mit L-Naphth und L-Chino besetzt. Auffallend war hierbei das Fehlen der Aminosäuren D-Leu, L-Phenanth und L-NaphthOMe, auch Lys und Arg waren kaum vertreten. Tendenziell sind die basischen Aminosäuren eher unterrepräsentiert, wohingegen die heterocyclischen und aromatischen Aminosäuren im bevorzugt auftreten. Diese Ergebnisse gehen konform mit den Untersuchungen aus der Phage-Display-Selektion. Auch hier zeigte sich, daß vor allem die heteroaromatische Aminosäure Tryptophan zur Bindung an die ψ -RNA beiträgt.^[29]

9.12 Optimierung der Inkubationsbedingungen durch eine neue Bibliothek

Um die Inkubationsbedingungen weiter zu optimieren, wurde eine 343 Tripeptide umfassende Bibliothek synthetisiert. Aus vorangegangenen Arbeiten waren bei der Inkubation mit TARwt-RNA Histidin-reiche Sequenzen isoliert worden.^[129] Diese Ergebnisse standen den Inkubationen der großen 4096er Bibliothek (I) gegenüber, bei der nur vereinzelt Histidin-reiche Sequenzen isoliert werden konnten. Desweiteren konnte anhand der durch Parallelsynthese hergestellten Tripeptide des Musters D-Arg-X-D-Arg gezeigt werden, daß diese eine starke Affinität zur TARwt-RNA aufweisen. Eine andere Tendenz zeigte sich jedoch bei der Inkubation mit TARbl. Hier konnten im Vergleich mehr Histidin-reiche Sequenzen isoliert werden. O. Boden konnte im Rahmen seiner Doktorarbeit durch HPLC-Untersuchungen zeigen, daß erst nach 24 stündiger Behandlungszeit mit TFA/TIS/Wasser eine vollständige Abspaltung gewährleistet ist. Da in den vorangegangenen Arbeiten nur vergleichsweise kurze Abspaltzeiten (5 h) gewählt wurden, ist zu vermuten, daß unvollständig abgespaltene Schutzgruppen zu einer Verfälschung der früheren Ergebnisse geführt haben könnten. Auch in den Arbeiten von Rana et al. wurden keine Arginin-haltigen Sequenzen identifiziert. Ein von Rana beschriebenes hochaffines Tripeptid (Lys-Lys-Asn)^[127] wurde im Arbeitskreis hergestellt und anhand des modifizierten FRET-Assays untersucht. Dieses Peptid zeigte jedoch nur einen IC₅₀ Wert im Bereich von 400 μ M und stand im Gegensatz zu den publizierten Ergebnissen. Um diese

Diskrepanz weiter zu untersuchen, erfolgte die Herstellung einer 343 Tripeptide umfassenden Bibliothek. Die 343 Tripeptide umfassende Bibliothek aus Standard-Aminosäuren sollte gleichzeitig zur Optimierung weitergehender Inkubationsbedingungen genutzt werden.

9.13 Herstellung einer 343er Bibliothek aus Standard-Aminosäuren

Zum Aufbau der Bibliothek wurden folgende Standard-Aminosäuren eingesetzt (Tab. 9.9):

Tab. 9.9: Standard-Aminosäuren der 343er Bibliothek

Standard Fmoc-Aminosäuren der 343er Bibliothek			
D-Lys(Boc)OH	L-Lys(Boc)OH	D-Arg(Pmc)OH	L-PheOH
L-LeuOH	L-His(Trt)OH	L-Arg(Pbf)OH	

Die Kodierung wurde über Reportermoleküle nach den optimierten Bedingungen vorgenommen. Um auszuschließen, daß eine Identifizierung aufgrund unvollständiger Kodierung nicht eindeutig ist, erfolgte für Arginin (sowohl L- als auch D-Konfiguration) eine Doppelkodierung, die bei dem Ausfall eines Reportermoleküls eine Sequenzbestimmung über den zweiten Tag ermöglichen sollte. Dieser „Ersatz-Tag“ wurde selbstverständlich nicht zur Kodierung anderer Sequenzen verwendet. Das zugehörige Tagmuster ist im experimentellen Teil tabellarisch dargestellt. Die Synthese dieser Bibliothek erfolgte unter den bekannten Bedingungen. Nach Abschluß der Synthese wurde auch diese Bibliothek am N-Terminus acetyliert. Für alle nachfolgend beschriebenen Inkubationen wurde acetyliertes Bibliotheks-Harz verwendet.

9.14 Inkubationen der 343er Bibliothek mit fluoreszenz-markierter RNA

Zur Inkubation der 343er Bibliothek wurden zunächst die Bedingungen aus den vorangegangenen Versuchen gewählt. Die Inkubationen wurden jedoch auf die Zielstruktur der TAR-RNA und ihrer Mutanten beschränkt.

Bei Inkubation der 343er Bibliothek mit TAR_wt (10 mg Harz, Verhältnis Tripeptide: RNA 7000:1) konnten jedoch zunächst keine fluoreszierenden Kugeln isoliert

werden. Die Konzentration an RNA wurde daraufhin verdoppelt. Auch danach ließen sich keine Liganden isolieren. Da die Vermutung bestand, daß die Bibliothek sehr viele RNA-bindende Sequenzen beinhaltet, wurde die Tripeptid-Konzentration herabgesetzt. Hierfür erfolgte zunächst die Synthese des acetylierten, ansonsten unbeladenen Rink-Amid-MBHA-Harzes. Um zu testen, ob das acetylierte Harz Einfluß auf die Inkubation zeigt und RNA bindet, erfolgte eine Inkubation des unbeladenen, acetylierten Harzes mit fluoreszenz-markierter RNA. Da keine hell leuchtenden Kugeln isoliert werden konnten, kann somit ein Effekt des acetylierten Harzes ausgeschlossen werden. Das so hergestellte Harz wurde daher als „Verdünnungskomponente“ bei allen folgenden Inkubationen verwendet.

9.15 Inkubation der acetylierten 343er Bibliothek mit TARwt

Aufgrund der beschriebenen Konzentrationsprobleme bei der Inkubation der 343er Bibliothek mit fluoreszenz-markierter TARwt mußte das Verhältnis von Tripeptiden zu RNA deutlich herabgesetzt werden. Da eine Erhöhung der RNA-Konzentration um den Faktor 10 zu erhöhtem Materialbedarf geführt hätte, wurde die Konzentration der Peptide entsprechend herabgesetzt. Hierfür wurde das Bibliotheksharz mit rein acetyliertem unbeladenem Harz im Verhältnis 1:5 verdünnt. Es wurde ein Verhältnis von Tripeptid zu RNA von 700:1 eingehalten. Auch für die folgenden Inkubationen wurden diese veränderte Inkubationsbedingungen beibehalten. Die identifizierten Tripeptide sind in Tab. 9.10 dargestellt.

Tab. 9.10: Identifizierte Tripeptidsequenzen aus der 343er Bibliothek nach Inkubation mit TARwt

Selektierte Tripeptide (C→NHAc) bei Inkubation mit TARwt	
L-Phe-L-Arg-L-Leu	D-Lys-L-Arg-L-Phe
D-Lys-D-Arg-D-Arg*	D-Lys-D-Arg-L-Phe*
L-Phe-D-Lys-L-His	L-Phe-L-Arg-L-Phe
L-Leu-D-Arg-D-Arg*	L-His-D-Arg-L-Phe
D-Lys-L-Phe-L-Phe	D-Lys-L-Phe-L-His
L-Leu-L-Leu-L-Phe	L-Phe-D-Arg-L-Phe
L-Arg-D-Arg-L-Phe*	

*hervorgehobene Tripeptide wurden neu synthetisiert und im *in vitro*

Assay auf ihre Bindungseigenschaften vermessen

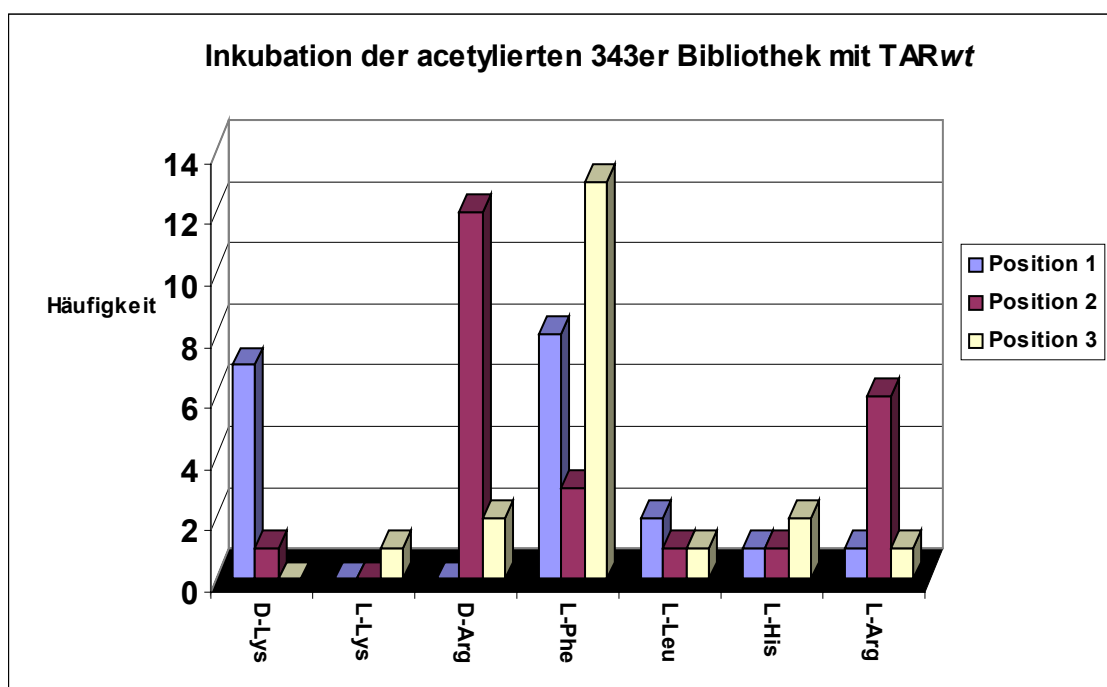


Abb. 9.14: Statistische Verteilung der Aminosäuren der 343er Bibliothek nach Inkubation mit TARwt

Die Inkubationsstatistik zeigt, daß für die erste Position L-Phe und D-Lys die größte Häufigkeit aufweisen (vgl. Abb. 9.14). Für die zweite Position zeigt vor allem D-Arg, gefolgt von L-Arg deutliche Affinität zur TAR-RNA. In der dritten Position trat L-Phe mit deutlichem Abstand als häufigste Aminosäure hervor. Eine Bevorzugung für L-His, wie aus den vorangegangenen Arbeiten bekannt war, ließ sich hier nicht bestätigen. Das läßt somit den Schluß zu, daß vermutlich nicht vollständig abgespaltene Schutzgruppen zu einer Verfälschung der Inkubation geführt haben. L-Lys und L-Leu traten bei den Inkubationsversuchen ebenfalls nur selten auf. Die Bevorzugung der Aminosäure L-His aus den vergangenen Inkubationen gab an dieser Stelle einen Hinweis darauf, daß es sich möglicherweise um gute Loop-Binder handelt.^[129] Zur Untersuchung dieser Hypothese wurde eine Inkubation mit TARb/ durchgeführt.

9.16 Inkubation der acetylierten 343er Bibliothek mit TARb/

Die Inkubation der acetylierten Bibliothek mit TARbulgeless erfolgte analog der eben beschriebenen Methode. Folgende vollständige Tripeptid-Sequenzen konnten detektiert werden (Tab. 9.11).

Tab. 9.11: Identifizierte Tripeptidsequenzen aus der 343er Bibliothek nach Inkubation mit TAR β l

Selektierte Tripeptide (C→NHAc) bei Inkubation mit TAR β l	
D-Lys-L-Arg-L-Arg	L-Phe-L-Phe-L-Lys
L-Lys-L-His-L-Lys	D-Lys-L-His-L-Arg
L-His-L-His-L-His*	L-Phe-L-Arg-L-Phe*
L-Leu-L-Phe-L-His	D-Lys-L-His-L-Phe
L-Leu-L-His-L-Leu	L-Phe-L-His-L-Arg*
L-His-L-Leu-L-Phe	L-His-L-Phe-L-Lys
L-Phe-L-His-L-Phe	L-Leu-D-Arg-L-Lys
L-Phe-D-Arg-L-Lys*	

*hervorgehobene Tripeptide wurden neu synthetisiert und im *in vitro* Assay auf ihre Bindungseigenschaften vermessen

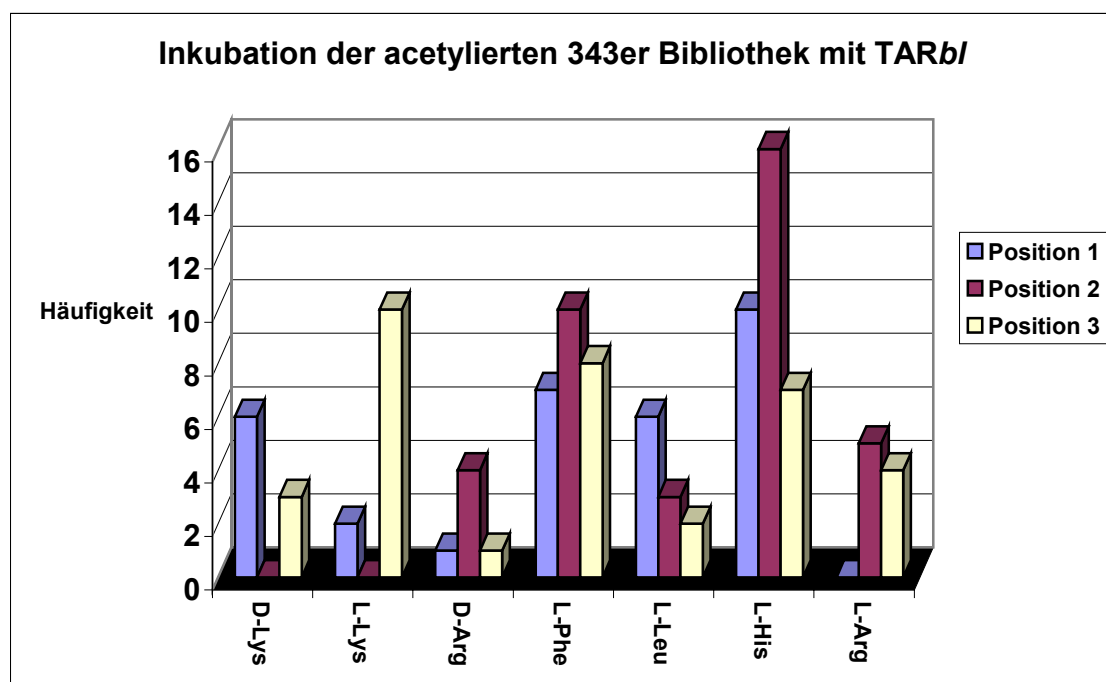


Abb. 9.15: Statistische Verteilung der Aminosäuren bei Inkubation mit TAR β l

Die Hypothese, daß es sich bei L-His um einen Loop-Binder handelt, konnte anhand dieser Inkubation mit TAR β lgeless bestätigt werden (vgl. Abb. 9.15). Während bei der Inkubation mit TAR α l L-His nur sehr vereinzelt innerhalb der Sequenzen identifiziert werden konnte, war die Aminosäure bei dieser Inkubation bevorzugt

vertreten. Entsprechend ging der Anteil an Arginin deutlich zurück. Eine weitere Präferenz zur Bindung an den Bulgebereich konnte für L-Phe nachgewiesen werden. Es wird deutlich, daß bevorzugt Aminosäuren mit aromatischen Seitenketten eine hohe Affinität zum Loop-Bereich der RNA zeigen.

9.17 Inkubation der 343er Bibliothek mit dem T10 Linker

Zwar konnte bereits bei der Inkubation der 4096er Bibliothek (II) ein Einfluß des T10-Linkers ausgeschlossen werden, ein eindeutiger Beweis für die 343er Bibliothek stand jedoch noch aus. Analog erfolgte die Inkubation mit dem T10-Linker, wobei das Verhältnis Tripeptid zu RNA konstant bei 700:1 gehalten wurde. Auch hier ließ sich keinerlei Bindung der Bibliothek an den T10 Linker nachweisen. Eine Verfälschung der Bindungseigenschaften der Bibliothek durch den T10 Linker konnte somit eindeutig ausgeschlossen werden.

9.18 Inkubation der acetylierten 343er Bibliothek mit TAR//

Um neben den Loop-Bindern auch Bulge-Binder zu identifizieren, wurde analog zur Inkubation der 4096er Bibliothek (II) die 343er Bibliothek mit TAR/*loopless* inkubiert. Bereits bei der Inkubation der großen Bibliothek mit TAR// wurde eine Vielzahl unterschiedlichster Sequenzen identifiziert. Es konnten folgende Sequenzen isoliert werden (Tab. 9.12):

Tab. 9.12: Identifizierte Tripeptidsequenzen aus der 343 er Bibliothek nach Inkubation mit TAR//

Selektierte Tripeptide (C→NHAc) bei Inkubation mit TAR//	
L-Leu-D-Arg-L-His	L-Phe-L-Arg-L-His
L-His-L-Arg-L-Lys	D-Lys-L-Phe-L-His
L-Lys-L-Leu-L-Arg	L-His-L-Phe-L-His
D-Lys-L-His-L-Phe	D-Lys-L-Leu-L-His
D-Lys-D-Arg-L-Phe	D-Arg-L-Leu-D-Arg
L-His-L-His-L-Phe	

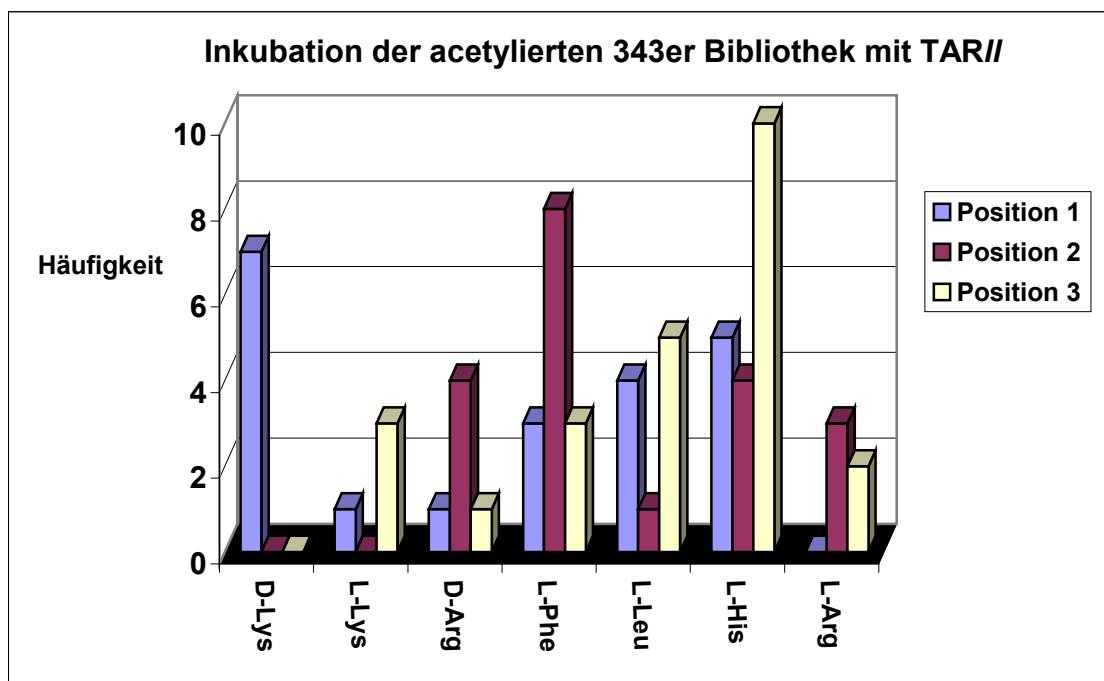


Abb. 9.16: Statistische Verteilung der Aminosäuren der Inkubation mit TAR//

Unerwarteter Weise ergab sich bei der Identifizierung der Tripeptid-Sequenzen in diesem Versuch ein relativ hoher Anteil an L-His (vgl. Abb. 9.16). In der mittleren Position zeigte sich eine deutliche Präferenz für L-Phe. Beim Vergleich mit der Statistik aus der Inkubation der *TARbulgeless* ergibt sich eine ähnliche Verteilung der Häufigkeit der verschiedenen Aminosäuren. Da bei der Inkubation mit *TARwt* nahezu keine His-reichen Sequenzen beobachtet werden konnten, deutet alles darauf hin, daß die verwendete *TARloopless* Variante nicht die gewünschte Sekundärstruktur ausbildet. Anhand der Statistik ist vielmehr davon auszugehen, daß statt der Duplex-Bildung mit interner Bulgeregion eine Bildung von Loopstrukturen favorisiert wird, die mit der *TARbulgeless* vergleichbar ist. Da eine Strukturaufklärung an dieser Stelle nicht möglich war, wurde von weiteren Inkubationen mit *TARloopless* abgesehen.

9.19 Weitere Methoden zur Auffindung von Bulge- und Loop-Bindern

Zwar war die Auffindung potentieller Loop-Liganden durch Inkubation mit *TARbulgeless* möglich, die Identifizierung der Bulge-Liganden konnte durch Inkubation mit *TARloopless* jedoch nicht durchgeführt werden. Es war daher von großem Interesse, ob die Identifizierung von Liganden bei der Inkubation mit *TARwt* nicht auch durch bestimmte Bedingungen beeinflusst werden kann. So sollte die *TARwt*-

RNA in Gegenwart von L-His-L-His-L-His im Loop-Bereich weitestgehend abgesättigt werden. Die Inkubation in Gegenwart von D-Arg-D-Arg-D-Arg hingegen sollte zur Absättigung des Bulgebereichs führen und die Bindung von Loop-Liganden favorisieren. Die Beeinflussung des Puffermediums sollte Einfluß auf die Bindung von hydrophoben und hydrophilen Liganden zeigen. Zu diesem Zweck wurden unterschiedlichste Inkubationen mit TARwt unter variierten Bedingungen durchgeführt.

9.20 Inkubation der acetylierten 343er Bibliothek mit TARwt in Gegenwart von L-His-L-His-L-His

Die Inkubation der 343er Bibliothek erfolgte analog zur beschriebenen Methode. Nach Zugabe der RNA wurden in einer ersten Inkubation zunächst nur 10 eq (bezogen auf RNA) des Tripeptids L-His-L-His-L-His zugegeben. Doch erst die Inkubation in Gegenwart von 100 eq lieferte Ergebnisse, die tendenziell mit der Inkubation für TARwt in TK-Puffer vergleichbar waren. Die detektierten Sequenzen sind hier dargestellt (vgl. Tab. 9.13). Eine komplette Liste aller Sequenzen und die Auswertung zur Statistik befindet sich im experimentellen Teil.

Tab. 9.13: Identifizierte Tripeptidsequenzen aus der 343er Bibliothek nach Inkubation mit TARwt in Gegenwart von L-His-L-His-L-His (100 eq)

Selektierte Tripeptide (C→NHAc) bei Inkubation mit TARwt und L-His-L-His-L-His	
D-Arg-L-Arg-L-Lys	D-Arg-D-Arg-L-Lys
L-Arg-L-Arg-L-Phe	L-Arg-L-Phe-L-Lys
D-Arg-L-His-L-Phe	L-Arg-D-Arg-L-Lys

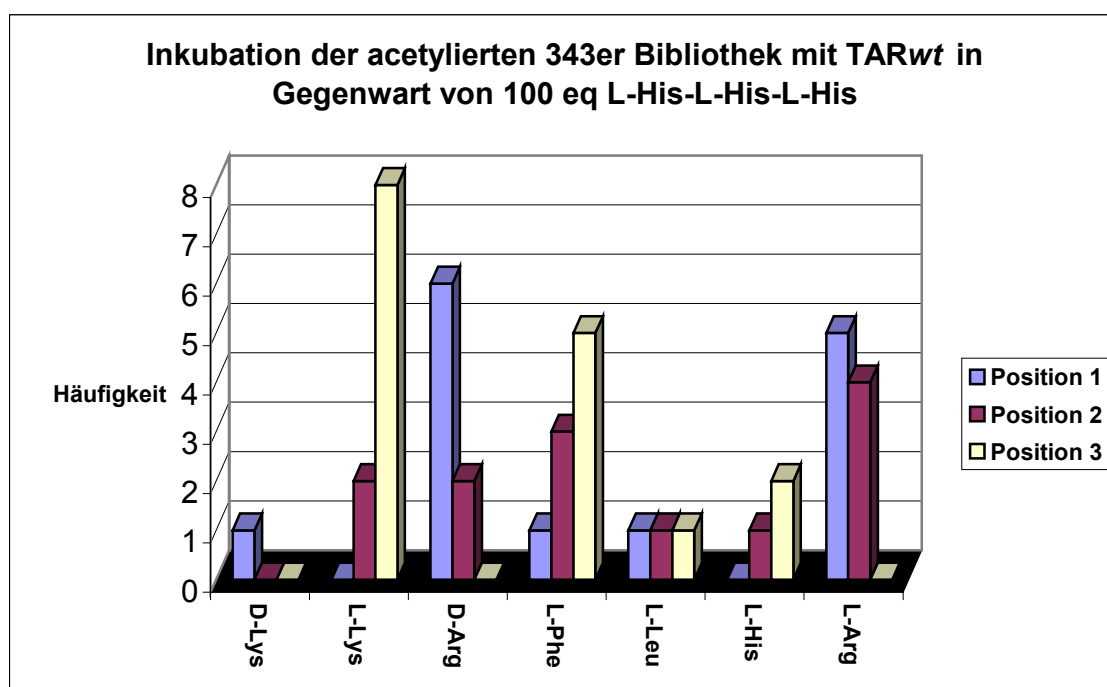


Abb. 9.17: Statistische Verteilung der Aminosäuren bei Inkubation mit TARwt in Gegenwart von L-His-L-His-L-His

Während L-Lys bei der ersten Inkubation kaum isoliert werden konnte, zeigte sich in Gegenwart von 100 eq L-His-L-His-L-His eine deutliche Präsenz für die dritte Position (vgl. Abb. 9.17). Die Situation für die Aminosäuren D- und L-Lys kehrte sich somit um. Der Anteil an Arg, war wie bei der Inkubation mit TARwt sehr hoch, der Anteil an L-His entsprechend niedrig. Bei dieser Inkubation war zum ersten Mal eine Differenzierung in der Helligkeit der leuchtenden Harzkugeln wahrzunehmen. So zeigte die Sequenz L-Arg-D-Arg-L-LysNHAc ein schwächeres Leuchten als andere Sequenzen (vgl. Tab. 9.13). Auch die Anzahl der RNA-bindenden Harzkugeln war in diesem Fall geringer als bei vorangegangenen Inkubationen.

9.21 Inkubation der acetylierten 343er Bibliothek mit TARwt im Medium Methanol : TK-Puffer 40:60

Um den Einfluß des Puffer-Mediums auf die Inkubation zu untersuchen, wurde auch dieser Parameter variiert. Zur Favorisierung ionischer Wechselwirkungen wurde statt des üblichen TK-Puffers eine methanolische TK-Puffer-Lösung eingesetzt. Dieses Medium sollte die hydrophilen Peptide begünstigen.

Die hell leuchtenden Kugeln waren zwar deutlich differenzierbar, im Vergleich zu den vorangegangenen Inkubationen war die Intensität erheblich schlechter als zuvor.

Desweiteren war auch die Anzahl der leuchtenden Kugeln geringer. Eine komplette Auflistung aller isolierten Sequenzen befindet sich im experimentellen Teil. Eine Auswahl ist hier dargestellt (vgl. Tab. 9.14).

Tab. 9.14: Identifizierte Tripeptidsequenzen aus der 343er Bibliothek nach Inkubation mit TARwt in variiertem Puffermedium

Selektierte Tripeptide (C→NHAc) bei Inkubation mit TARwt in Gegenwart von MeOH:TK-Puffer 40:60	
L-Arg-L-Arg-L-Lys	L-Leu-D-Arg-L-Lys
D-Arg-D-Arg-L-Lys	L-Arg-L-Phe-L-Phe
L-Arg-L-Phe-L-Phe	D-Arg-L-Lys-L-Lys

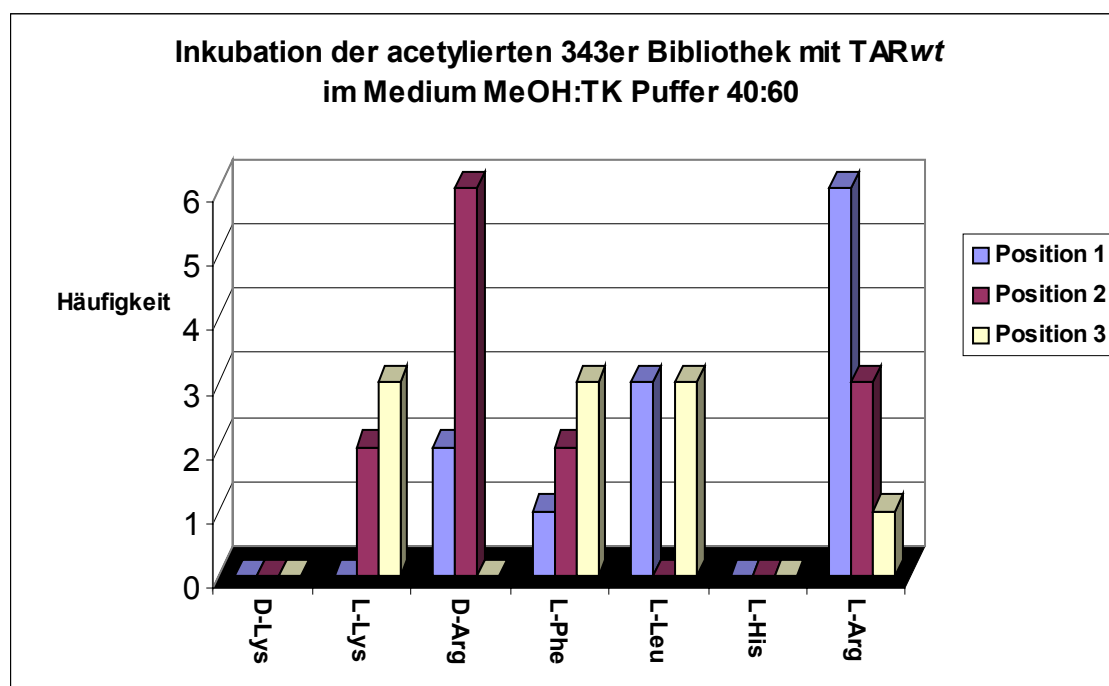


Abb. 9.18: Statistische Verteilung der Aminosäuren nach Inkubation mit TARwt in variiertem Puffermedium

Auffallend bei dieser Inkubation ist zunächst einmal der Anstieg an Arg beider Konfigurationen (Abb. 9.18). Der Anteil an L-Phe ging erwartungsgemäß zurück und L-Leu überraschte hierbei durch einen relativen Anstieg. Letzteres trat jedoch immer

nur in Verbindung mit Arginin auf. Der Vergleich von D- und L-Lys ist gleichermaßen überraschend. So zeigte sich bei Inkubation mit TARwt bei erhöhter Methanol-Konzentration eine Umkehrung bei der bevorzugten Konfiguration. Während hier kein D-Lys nachgewiesen werden konnte und der Anteil an L-Lys jedoch recht erheblich war, spiegelte dieses Ergebnis eine nahezu exakte Umkehrung der Verhältnisse zur Inkubation in reinem TK-Puffer wider. Dieses Phänomen erklärt sich nicht mehr allein durch die Bevorzugung ionischer Wechselwirkungen und bedarf weiterer Untersuchungen.

9.22 Inkubation der acetylierten 343er Bibliothek mit TARwt in Gegenwart erhöhter Salzkonzentration

Nach diesen Ergebnissen sollte zusätzlich der Einfluß einer erhöhten Salzkonzentration auf die Inkubation getestet werden. Harzkugeln mit basischen Seitenketten sollten in diesem Medium aufgrund der ionischen Wechselwirkungen mit dem Puffermedium bei der RNA-Bindung benachteiligt sein. Die Bedingungen der Inkubation waren analog der Standard-Inkubation. Es wurde jedoch zum verwendeten TK-Puffer x1 (20 mM KCl) durch Zugabe von Natriumchlorid eine Salzkonzentration von 130 mM (NaCl) erzeugt. Nach der Inkubation konnten auch hierbei Unterschiede in der Intensität der Fluoreszenz beobachtet werden. Wie in der vorangegangenen Inkubation war auch hier die Anzahl der selektierten Kugeln geringer. Folgende Sequenzen wurden isoliert (Tab. 9.15):

Tab. 9.15: Identifizierte Tripeptidsequenzen aus der 343er Bibliothek nach Inkubation mit TARwt bei erhöhter Salzkonzentration

Selektierte Tripeptide (C→NHAc) bei Inkubation mit TARwt	
L-His-L-Lys-L-His	D-Lys-L-Leu-L-His
D-Arg-L-Arg-L-Phe	L-His-L-His-L-Phe
D-Lys-D-Arg-D-Arg	

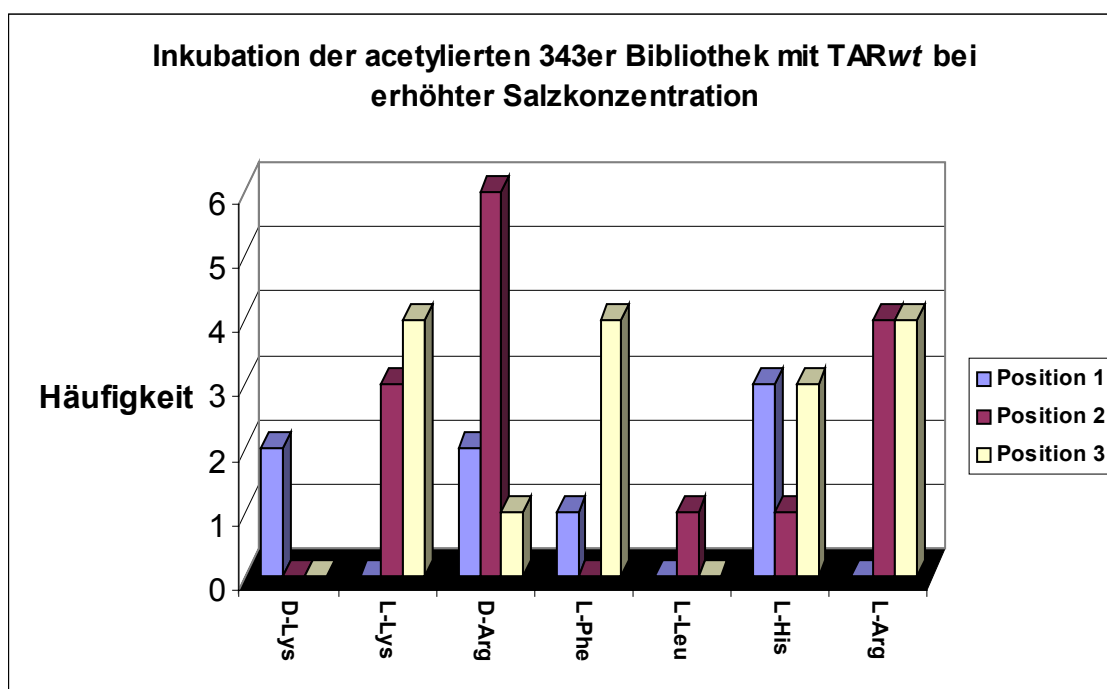


Abb. 9.19: Statistische Verteilung der Aminosäuren nach Inkubation mit TARwt und erhöhter Salzkonzentration

Aus der Statistik geht hervor, daß die erhöhte Salzkonzentration keinen Einfluß auf die Bindungseigenschaften der basischen Aminosäuren zeigt (vgl. Abb. 9.19). Der Anteil konnte unter diesen Bedingungen nicht zurück gedrängt werden. Der Anteil an L-Histidin stieg jedoch leicht an. Trotz der hohen Salzkonzentration zeigt vor allem Arg noch immer eine hohe Affinität zur TARwt. Das gibt den Hinweis darauf, daß es sich hierbei um eine starke Wechselwirkung handeln muß. Eine eindeutige Bevorzugung hydrophober Liganden ließ sich nicht nachweisen.

9.23 Inkubation der acetylierten 343er Bibliothek mit TARwt in Gegenwart von D-Arg-D-Arg-D-Arg

Diese Inkubation wurde analog zu der Inkubation in Gegenwart von L-His-L-His-L-His durchgeführt. In diesem Fall wurden allerdings 100 eq D-Arg-D-Arg-D-Arg hinzugesetzt. Eine Auflistung der vollständigen Sequenzen ist in der Tabelle 9.16 dargestellt. Eine komplette Liste aller isolierten Tripeptide befindet sich im experimentellen Teil.

Tab. 9.16: Identifizierte Tripeptidsequenzen aus der 343er Bibliothek nach Inkubation mit TARwt in Gegenwart von D-Arg-D-Arg-D-Arg

Selektierte Tripeptide (C→NHAc) bei Inkubation mit TARwt	
L-Lys-L-His-L-Arg	D-Lys-D-Arg-D-Lys
L-Phe-L-Arg-D-Arg	D-Lys-L-Arg-L-Arg
L-Phe-L-Arg-L-Phe	L-Leu-L-Arg-L-Phe
L-His-L-His-L-Phe	L-Phe-L-His-L-Lys
D-Lys-L-Leu-L-Arg	D-Lys-L-His-L-Phe
L-Leu-L-His-L-Arg	D-Lys-L-His-L-Phe
L-Phe-L-Arg-L-Phe	

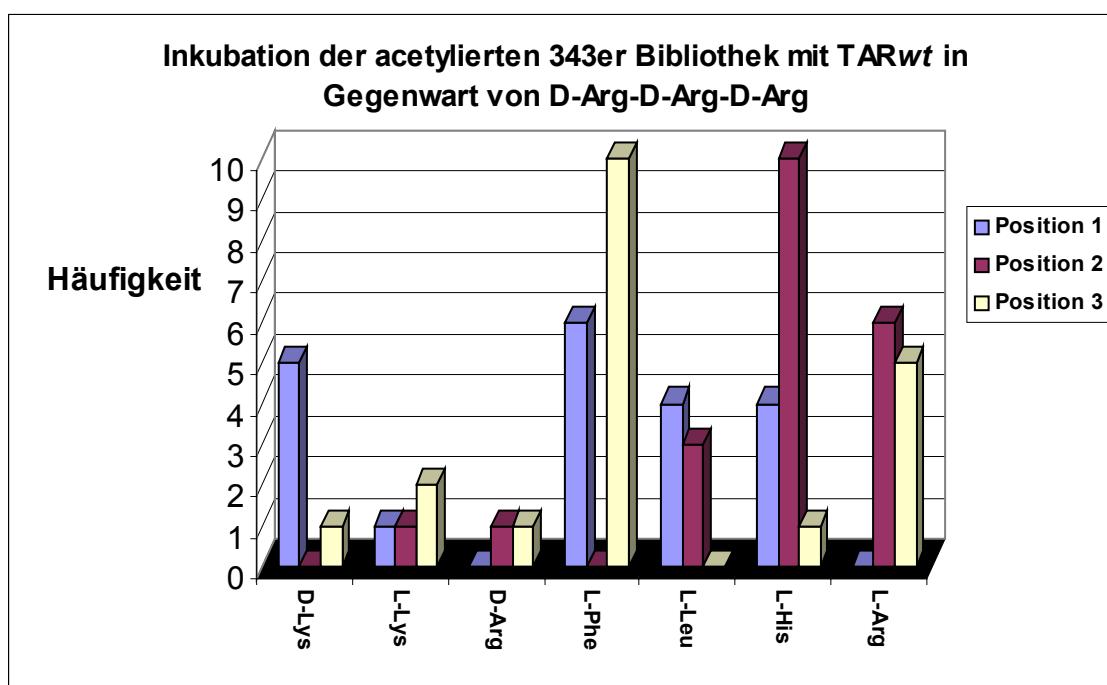


Abb. 9.20: Statistische Verteilung der Aminosäuren aus der Inkubation mit TARwt in Gegenwart von D-Arg-D-Arg-D-Arg

So sollte eine Inkubation in Gegenwart von D-Arg-D-Arg-D-Arg dazu gedacht sein, den Bulge-Bereich zu sättigen und nur noch potentielle Loop-Liganden zu selektieren. Bei dieser Inkubation der 343er Bibliothek mit TARwt in Gegenwart von D-Arg-D-Arg-D-Arg konnte ein enormer Anstieg von L-His nachgewiesen werden (vgl. Abb. 9.20). Die statistische Verteilung ist vergleichbar mit den Ergebnissen aus der Inkubation mit TARbl. Im Fall von L-Phe stieg der Anteil in Gegenwart von D-Arg-D-Arg-D-Arg jedoch noch weiter an.

9.24 Ergebnisse aus den Bibliotheken im Überblick

Nach Optimierung der Synthesebedingungen für die Bibliothek war es bei der Inkubation mit TAR*w_t* in beiden Bibliotheken möglich, Liganden zu selektieren. Ein Einfluß des T10-Linkers auf die Bindung von Liganden zur RNA konnte eindeutig ausgeschlossen werden, da sich bei der Inkubation mit T₁₀*fl* keine fluoreszierenden Harzkugeln isolieren ließen. Eine Unterscheidung zwischen potentiellen Loop- und Bulgebindern erfolgte durch den Einsatz von TAR-Mutanten. Für die Identifizierung von Loop-Bindern stand hierbei eine TAR*bulgeless* -Mutante zur Verfügung. Anhand der 343er Bibliothek ließ sich recht deutlich zeigen, daß der Anteil an basischen Aminosäuren in dieser Inkubation nicht sehr ausgeprägt war. L-His, welches sehr stark hervorgetreten war, wies sich hierbei als sehr guter Loop-Binder aus. Dieser Trend konnte durch *in vitro* Studien belegt werden. Bei den Inkubationen der 4096er Bibliothek (II) hingegen zeigte sich ein anderer Trend. Der Anteil an basischen Aminosäuren stieg in Gegenwart von TAR*bulgeless* an. Während D-2pyridyl bei der Inkubation mit TAR*w_t* als Hauptbestandteil auftrat, stand bei der Inkubation mit TAR*bulgeless* das Isomer D-3pyridyl im Vordergrund. Bei dieser Inkubation zeigte sich auch eindeutig ein Einfluß der Stereochemie der verwendeten Aminosäuren. So waren bei den Enantiomeren von Lys und Pyrazinyl deutlich die L-konfigurierten Aminosäuren dominant. Die Untersuchungen mit der TAR*loopless*-Mutante hingegen lieferte keine eindeutigen Ergebnisse. Das Auftreten von L-His, das seine Präferenz für den Loop-Bereich gezeigt hatte, deutete darauf hin, daß die RNA Mutante nicht in der gewünschten Sekundär-Struktur vorliegt und somit zu einem uneinheitlichen Bindungsmuster führt. Das Problem konnte jedoch ansatzweise durch die Kombination aus TAR*w_t*-RNA und des Loop-Binders L-His-L-His-L-His gelöst werden. Die Absättigung des Loop-Bereichs der TAR*w_t* führte hierbei zu einer neuen Verteilung, in der L-His (als polymergebundener Ligand) nur sehr schwach vertreten war. Es bedarf einer weiteren Optimierung, wie z. B. der Steigerung der Konzentration an L-His während der Inkubation, bzw. den Zusatz anderer hochaffiner Loopbinder. Diese Inkubationsbedingungen haben jedoch gezeigt, daß eine derartige Beeinflussung der RNA-Bindung durchaus möglich ist. Desweiteren wurde untersucht, ob die Variation des wäßrigen Mediums einen Einfluß auf die Bindungseigenschaften zeigt. So sollte durch Zusatz von Methanol der Anteil an hydrophilen Tripeptiden begünstigt werden. Anteilsmäßig stieg vor allem die Häufigkeit der Aminosäure Arg an, die Aminosäuren L-Phe und L-Leu konnten dabei nicht komplett zurückgedrängt werden. Weitere

Untersuchungen mit einem vergleichsweise unpolarem Lösungsmittelanteil sollten daher die hydrophilen Binder weiter begünstigen. Eine Beeinflussung der Bindungseigenschaften durch eine Erhöhung der Salzkonzentration konnte nicht nachgewiesen werden. Zwar zeigten sich auch Unterschiede in der Präsenz von D- und L-Lys, jedoch ergab sich für die Aminosäuren L-Phe und L-Leu keine deutliche Steigerung. Die verminderte Fluoreszenzintensität der Harzkugeln deutet jedoch bereits darauf hin, daß die Bindung von RNA unter diesen Bedingungen geschwächt wird. Weitergehende Erhöhungen der Salzkonzentration könnten daher möglicherweise zu komplettem Bindungsverlust führen. Allgemein ließen sich sehr viele verschiedene Sequenzen isolieren, wobei die Harzkugeln in gleicher Fluoreszenzintensität leuchteten. Gleichzeitig war von Interesse, ob sich der beste Ligand identifizieren läßt. Hierzu wurden eine Reihe von Triptiden neu synthetisiert, um sie im *in vitro* Assay auf ihre Affinität zur RNA zu untersuchen. Neben potentiellen Bulge-Bindern wurden auch vermeintliche Loop-Binder hergestellt, um einen Vergleich anstellen zu können.

9.25 Bestimmung der IC_{50} -Werte der potentiellen TAR-Liganden

Aus den Inkubationen gingen diverse Tripeptide mit RNA-bindenden Eigenschaften hervor. Einige Sequenzen hieraus wurden mittels Festphasensynthese (Rink-Amid-Harz) hergestellt. Neben Bulge-Liganden erfolgte hierbei auch die Synthese von Loop-Bindern. Anhand des *in vitro* Fluoreszenz-Assays (TAR_{wt}-RNA) wurden die IC_{50} -Werte dieser Tripeptide bestimmt. Sie sind in der nachfolgenden Tabelle 9.17 aufgeführt:

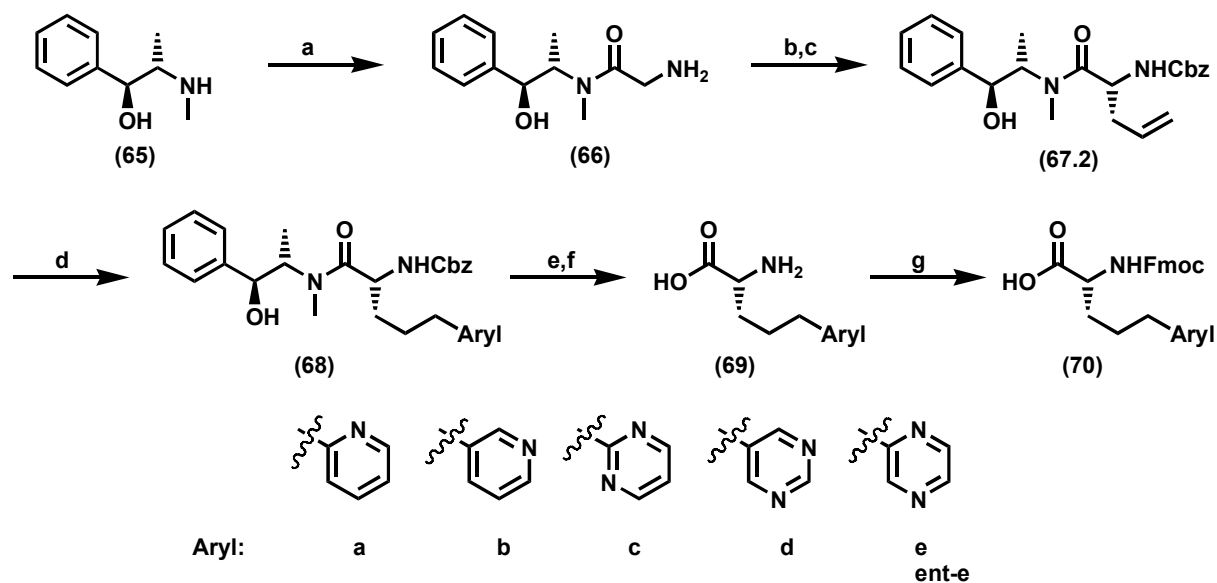
Tab. 9.17: Anhand des TARwt-Assays ermittelte IC_{50} Werte identifizierter Tripeptide (acetyliert) C→NHAc

Loop-Binder	IC_{50} (μ M)	Bulge-Binder	IC_{50} (μ M)
D-2pyridyl-D-3pyridyl-D-Arg (97)	500	D-Lys-D-Arg-D-Arg (103)	80
L-Phe-L-Arg-L-Phe (98)	600	D-2pyridyl-D-2pyridyl-D-2pyrim (104)	150
L-Asn-D-2pyrim-D-2pyridyl (99)	950	D-Phe-D-2pyrim-D-2pyridyl (105)	280
L-Phe-L-His-L-Arg (100)	2000	L-Leu-D-Arg-D-Arg (106)	300
L-Phe-D-Arg-L-Lys (101)	3000	L-Arg-D-Arg-L-Phe (107)	300
L-His-L-His-L-His (102)	3200	D-Lys-D-Arg-L-Phe (108)	350

Beim Vergleich der IC_{50} Werte zeigt sich, daß eine Unterscheidung von Loop- und Bulge-Bindern mittels des Festphasen-Assays möglich ist (vgl. Tab. 9.17). Die Loop-Liganden zeigten hierbei erwartungsgemäß schlechtere inhibitorische Eigenschaften im Bulge-Bereich von 500 bis 3200 μ M (TARwt-Assay). Für die Bulge-Liganden erhielt man vergleichsweise bessere IC_{50} -Werte. Sie bewegten sich im Bereich von 80 bis 350 μ M. Bei den neu synthetisierten Tripeptiden handelte es sich um eine kleine Auswahl der aus den Inkubationen hervorgegangenen Liganden. Zwar ist eine Unterscheidung zwischen Loop- und Bulgebindern eindeutig gegeben, die identifizierten Bulgebinder weisen jedoch IC_{50} -Werte im zweistelligen μ molaren Bereich auf. Da bei den einzelnen Inkubationen alle fluoreszierenden Kugeln eine vergleichbare Leuchtintensität aufwiesen, ist an dieser Stelle nicht auszuschließen, daß sich unter ihnen sehr viel bessere Liganden befinden, die möglicherweise im nmolaren Bereich an die TARwt-RNA binden. Für eine bessere Differenzierung der Liganden sind daher weitere Optimierungen erforderlich.

10 Zusammenfassung

Das Haupt-Target dieser Arbeit war die TAR_{wt}-RNA des HIV-1. Es handelt sich hierbei um eine hochkonservierte Struktur, die am 5' Ende aller HIV-1 Transkripte lokalisiert ist. Die Interaktion einer Arginin-reichen Sequenz innerhalb des Tat-Peptids mit der Bulgeregion der TAR-RNA führt zu einer erhöhten Prozessivität der RNA-Polymerase II und damit zum Anschalten der Transkriptions-Maschinerie. Als Folge ergibt sich eine starke Vermehrung des Virus. Das Ziel war es daher Liganden zu identifizieren, die diese RNA-Protein-Wechselwirkung unterbinden und somit die Vermehrung des Virus einschränken. Es gibt bereits einige bekannte TAR-Liganden, von deren Struktur sich die Anforderungen an den idealen TAR-Binder ableiten lassen. Neben einer guten Protonierbarkeit, sollte der ideale Ligand über H-Donor und -Akzeptor-Stellen verfügen um zur Wechselwirkung mit der RNA beizutragen. Eine weitere Stabilisierung des RNA-Ligand-Komplexes wird durch Stacking Wechselwirkungen ermöglicht, die durch aromatische Strukturen innerhalb der Liganden begünstigt werden. Da die potentiellen Liganden außerdem synthetisch leicht zugänglich sein sollten, wurde der Fokus auf Tripeptide gelegt, da sie einen schnellen Zugang über die Festphasensynthese ermöglichen. Die Anzahl aromatischer Aminosäuren ist jedoch begrenzt und die Möglichkeit zur Ausbildung von Stacking-Wechselwirkungen somit eingeschränkt. Ein zentraler Abschnitt im Rahmen dieser Arbeit war daher ein Zugang zu neuen heteroaromatischen Aminosäuren. Anlehnend an die von Myers et al. beschriebene Synthese von Aminosäuren wurde hierbei mittels des Auxiliars Pseudoephedrin die stereoselektive Alkylierung eines Glycinamids durchgeführt.^[132] Besonders wichtig war dabei die Synthese eines zentralen chiralen Bausteins und der nachfolgende racemisierungsfreie Syntheseverlauf. Nach der Schützung der Aminofunktion des Derivates (**67.2**) konnten durch eine Suzuki-Reaktion einige heteroaromatische Seitenketten eingeführt werden. Entschützung der Aminofunktion und Abspaltung des Auxiliars lieferten die freien Aminosäuren, die nach der Schützung der Aminofunktion durch Fmoc-Cl als Monomerbausteine zum Einsatz in der kombinatorischen Bibliothek bereitstanden. Neben der Synthese des D-Pyrazinyl-Derivates gelang durch Verwendung des (*R,R*)-Pseudoephedrins die Synthese des L-Pyrazinyl-Derivates. Durch HPLC-Untersuchungen konnte der racemisierungsfreie Verlauf dieser Synthese belegt werden, wobei Enantiomerenüberschüsse von 99 % bestimmt wurden (Abb. 10.1).



(a) LiOtBu , THF, Glycinmethylester HCl, 68 % (b) $\text{LiN}(\text{TMS})_2$, LiCl, THF, Allylbromid, 0 °C, 65 % (c) CHCl_3 , Et_3N , Cbz-Cl, 87 % (d) 9-BBN, THF dann K_3PO_4 , Aryl-X, $\text{Pd}[\text{PPh}_3]_4$, 5 mol %, 27-90 % (e) MeOH, H_2 , Pd/C (f) H_2O , Rückfluß, 60 % (2 Stufen) (g) TMS-Cl, DCM, DIPEA, Fmoc-Cl, 70 %

Abb. 10.1: Syntheschema neuartiger aromatischer Aminosäuren

Um den generellen Nutzen der neuen Aminosäuren für die Festphasensynthese zu demonstrieren, wurden zunächst Tripeptide des Musters Arg-X-Arg hergestellt.^[133]

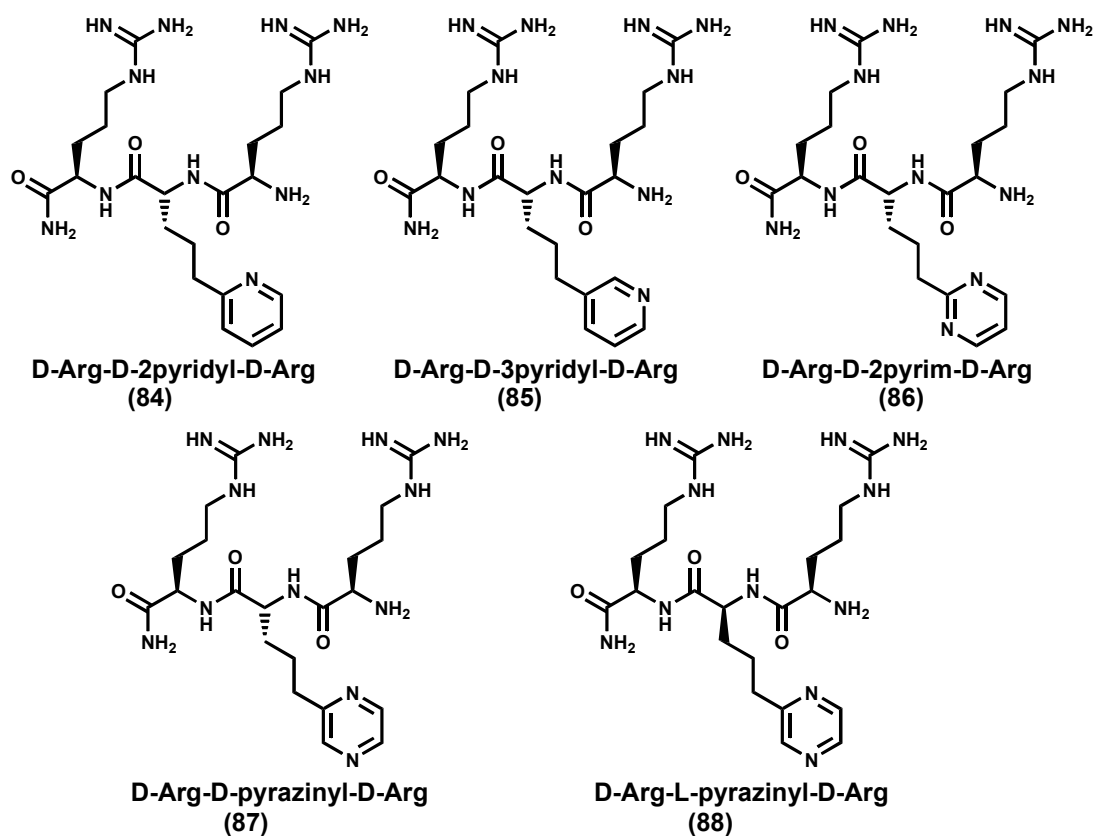


Abb. 10.2: Tripeptide aus nicht-natürlichen Aminosäuren

Auf diese Weise gelang die Synthese von fünf Tripeptiden, wobei sich das 5-Pyrimidinyl-Derivat (**70d**) aufgrund von Nebenreaktionen nicht für den weiteren Einsatz in kombinatorischen Bibliotheken eignete (Abb. 10.2).

Die Affinität der Tripeptide zur TAR_{wt}-RNA wurde zunächst anhand eines *in vitro* Fluoreszenz-Assays bestimmt. Das 2-Pyrimidinyl-Derivat zeichnete sich hierbei durch einen niedrigen IC₅₀-Wert (2 µM) aus. Durch NMR-Studien konnte der Bindungsort des Tripeptids innerhalb der Bulgeregion der TAR_{wt}-RNA HIV-1 als auch HIV-2 lokalisiert werden. Anhand eines Konkurrenzexperimentes konnte gezeigt werden, daß das Tripeptid wesentlich besser an die TAR-RNA des HIV-2 bindet als der bereits sehr gut untersuchte Ligand Argininamid (Kooperation mit den Arbeitskreisen Prof. Dr. H. Schwalbe, Dr. J. Wöhnert). Auch die *in vivo* Studien (Reportergen-Assay) belegten für dieses Derivat deutlich bessere IC₅₀-Werte (40 µM) als die vergleichbaren anderen nicht-natürlichen Tripeptide (Kooperation mit Dr. U. Dietrich). Aus Langzeitexperimenten konnte der Nachweis erbracht werden, daß es sich hierbei um einen Tat-TAR-Inhibitor handelt.

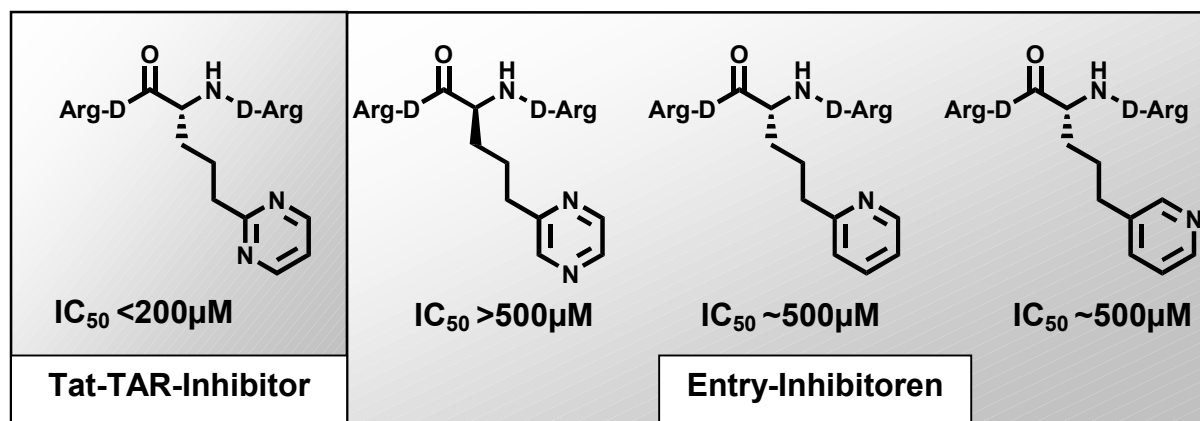


Abb. 10.3: Antivirale Tripeptide

Drei andere Tripeptide inhibierten die HIV-Infektion auf Entry-Ebene. Somit konnten vier antiviral wirkende Verbindungen identifiziert werden (Abb. 10.3).

Die aus der stereoselektiven Synthese gewonnenen Aminosäuren wurden in einer kombinatorischen Bibliothek eingesetzt. Anhand dieser 4096 Tripeptide umfassenden Bibliothek konnten neben Bulge- auch Loop-Liganden für die TAR-RNA identifiziert werden. Zur weiteren Optimierung erfolgte die Synthese einer zweiten Bibliothek, die aus Standard-Aminosäuren aufgebaut wurde. Auch hier wurden Bulge- und

Loop-Binder der TAR*wt*-RNA identifiziert und die Inkubationsbedingungen anhand verschiedenster Parameter variiert. Ausgewählte Beispiele der aus den Bibliotheken identifizierten Tripeptiden wurden synthetisiert. Anhand des *in vitro* Fluoreszenz-Assays wurde die Affinität zur TAR*wt*-RNA bestimmt. Es erfolgte eine deutliche Unterscheidung zwischen Loop- und Bulge-bindenden Tripeptiden. Durch den Aufbau eines neuen *in vitro* TAR*bulgeless*-Assays konnte das Bindungsverhalten von ausgewählten Tripeptiden zur Loop-Region untersucht und verglichen werden.

Durch die kombinatorischen Bibliotheken kann die Suche nach potentiellen Liganden sehr schnell auf weitere Target-RNAs übertragen werden kann. Dieses konnte durch die erfolgreiche Ligandensuche für die Targets ψ -RNA des HIV-1 und mRNA des onkogenen Bcr-Abl-Proteins gezeigt werden.

11 Ausblick

Neben der Identifizierung antiviraler Verbindungen konnte im Rahmen dieser Arbeit ein Beitrag zur Konzeption des idealen TAR-RNA-Liganden geliefert werden. Die Kombination eines Bulge- und Loop-Liganden über eine Linkerfunktion sollte zu einem hochaffinen TAR*wt*-Binder führen. Durch die Verkleinerung der Bibliotheken, in der nur noch zuvor auffällige Aminosäuren verwendet werden, sollte eine weitere Affinitätssteigerung bei identifizierten Tripeptiden möglich sein.

Die laufenden Studien zur NMR-Strukturaufklärung des Pyrimidinyl-TAR-Komplexes werden weitere Aufschlüsse über die RNA-Ligand-Wechselwirkungen geben. Durch die Ermittlung der für die Peptid-RNA-Bindung erforderlichen Positionen sollte es desweiteren möglich sein, anhand dieser Daten den idealen TAR-Liganden zu modellieren.

12 Experimenteller Teil

12.1 Allgemeine experimentelle Bedingungen

NMR-Spektroskopie:

NMR-Spektren wurden mit dem Gerät AM 250 (250-MHz) der Firma Bruker aufgenommen. Die Angabe der chemischen Verschiebung δ erfolgte in ppm, wobei das jeweilige Lösungsmittel (d^6 -DMSO, $\delta = 2.49$) als interner Standard diente. Die Feinstruktur der Protonensignale wurde mit s für Singulett, d für Dublett, t für Triplett, q für Quartett oder m für Multiplett angegeben. Die Spektren wurden bei Raumtemperatur aufgenommen. Die zugehörigen Kopplungskonstanten J wurden in Hz berechnet. Rotamere sind mit d^* gekennzeichnet.

Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FT-IR):

Die Aufnahme von IR-Spektren erfolgte mit dem Gerät Perkin-Elmer 1600. Die Wellenzahlen wurden in cm^{-1} angegeben und auf ganze Zahlen gerundet.

Massenspektroskopie:

ESI-MS: Fisons VG Platform II

Elementaranalysen:

Heraeus CHN-Rapid

Schmelzpunkte:

Heiztischmikroskop nach Kofler, unkorrigiert

Ultraviolett-spektroskopie (UV):

UV-Bestimmungen erfolgten mit dem Gerät Cary Bio-1E mit Cary WinUV.

Drehwerte:

Drehwertbestimmung wurden mit dem Gerät Perkin Elmer Polarimeter 241 mit Thermostat Haake G und Haake D8 gemessen.

Dünnschichtchromatographie:

Zur Dünnschichtchromatographie wurden Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄ (Schichtdicke 0.2 mm) der Firma Merck verwendet. Die Detektion UV-aktiver Substanzen erfolgte mit einer UV-Lampe bei 254nm bzw. 366 nm und/oder durch Anfärben mit Ninhydrin-Lösung (3.65 g Ninhydrin in 25 ml n-Butanol und 25 ml Aceton; primäre Amine färben nach dem Auftragen und Erhitzen violett).

Präparative Säulenchromatographie:

Zur Aufreinigung der Rohprodukte wurde das Kieselgel 60 (0.04-0.063 mm) der Firma Merck verwendet.

Präparative Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC):

Die Retentionszeit der HPLC-gereinigten Tripetide wurde über folgende Laufmittel bestimmt:

Grad #1 :

Minuten	0	5	20	25	30	40
H ₂ O:CH ₃ CN	99:1	99:1	30:70	30:70	99:1	99:1
(0.1% TFA)						

Wasserfreie Lösungsmittel:

Nach Vortrocknen des THFs durch Aluminiumoxid (ICN Alumina N-Super I) wurde von Natrium/Benzophenon abdestilliert.

Lyophilisierung:

Nach dem Trocknen im Vakuum wurden die Verbindungen mit dem Gerät Christ Alpha 2-4 über Nacht getrocknet.

Zentrifugen:

Zum Abzentrifugieren der Peptide und Herstellung der RNA wurden folgende Zentrifugen benutzt: Kühlbare Tischzentrifugen Eppendorf 5417R und Hettich EBA 12 R.

In vitro Messungen:

Die *in vitro* Messungen wurden in 96-well Platten der Firma Corning (schwarz, non-binding surface, Nr.3650) auf dem Fluostar der Firma BMG-Labtechnologies bei 37 °C durchgeführt.

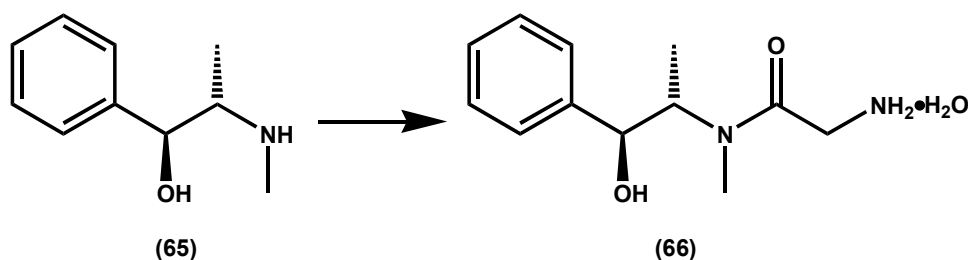
Steriles Arbeiten:

Zur Vorbeugung einer Kontamination mit RNAsen wurden alle Experimente mit RNAs mit sterilen Einmalgeräten oder autoklavierten Plastikerzeugnissen durchgeführt. Durch Behandlung von Milipore-Wasser mit 0.1 % (v/v) DEPC über Nacht bei Raumtemperatur und anschließend Autoklavieren (30 Minuten bei 121 °C) wurde steriles Wasser generiert. Für RNA-Lösungen, Reaktionspuffer und Peptid-Lösungen wurde steriles Wasser (DEPC-behandelt) verwendet. Bei der Durchführung dieser Experimente wurden Latex-Einmalhandschuhe getragen.

13 Monomerbausteine und Tripeptide

13.1 Synthese der Monomerbausteine

13.1.1 Synthese von (*S,S*)-Pseudoephedrin-glycinamid-Hydrat (**66**) und (*R,R*)-Pseudoephedrin-glycinamid-Hydrat (**ent-66**)



(+)-(*S,S*)-Pseudoephedrin (25.0 g, 0.151 mol) und Glycinmethylester-Hydrochlorid (24.70 g, 0.197 mol) wurden in einem ausgeheizten Dreihalskolben vorgelegt. Der Kolben wurde mehrfach mit Argon gespült und anschließend erfolgte die Zugabe von THF (210 ml). Die Suspension wurde für 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Abschließend wurde Lithium-*tert*butoxid (16.92 g, 0.211 mol) in einer Portion unter leichtem Argongegenstrom hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde nach einiger Zeit gelblich klar. Nach dreistündigem Rühren bei RT wurde das Reaktionsgemisch aufgearbeitet. Hierzu wurden langsam 180 ml Wasser zugegeben und das THF am Rotationsverdampfer weitestgehend entfernt. Die verbleibende wäßrige Phase wurde mehrfach mit CH_2Cl_2 (5x300 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über K_2CO_3 getrocknet. Nach Abzug des Lösungsmittels und Trocknen im Vakuum erhielt man ein gelbes viskoses Öl. Dieses wurde mit heißem THF aufgenommen (150 ml) und abschließend erfolgte die Zugabe von 5 ml Wasser. Nach Aufbewahrung der Lösung bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ über Nacht fiel ein weißer Feststoff aus. Das Produkt wurde abfiltriert und mit eiskaltem Diethylether nachgewaschen. Das Produkt (**66**) wurde als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 58 % erhalten, Kristallisation der Mutterlauge ergab weitere 10 %.

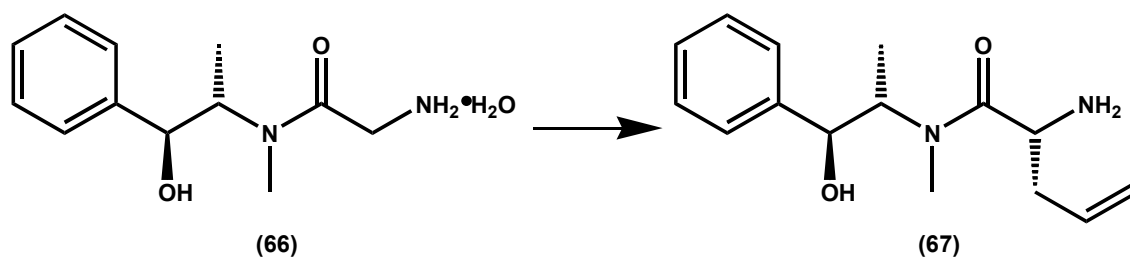
DC: $R_f = 0.46$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ 8:2:1);

Schmelzpunkt: $86\text{ }^\circ\text{C}$,^[88]

Drehwert:	$[\alpha]_D^{20} = +96.3^\circ$ (c = 0.8, MeOH);
$^1\text{H-NMR}$	(400 MHz, CDCl_3): δ = 7.36-7.24 (m, 5H), 4.62-4.56 (m, 1H), 4.53 (d, J=8.5 Hz, 1H), 4.47-3.64 (m, 2H), 2.89 (s*, 1H), 2.75 (s, 2H), 2.7 (bs, 2H), 0.98 (d, J=6.8 Hz, 2H), 0.91 (d, J=6.8 Hz, 1H);
IR (KBr):	$\tilde{\nu}$ = 3443, 3285, 1636, 1453, 1410, 1310, 1276, 1199, 1142, 1106, 1055, 1022, 965, 923, 793, 760, 701, 613, 585, 559 ;
Elementaranalyse:	$\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3$ (240.15)
Berechnet (%):	C 59.98, H 8.39, N 11.66;
Gefunden (%):	C 60.02, H 8.37, N 11.54.

Die Synthese des (*R,R*)-Pseudoephedrin-glycinamids (**ent-66**) erfolgte analog zur oben beschriebenen Methode. Als Edukt wurde jedoch (*R,R*)-Pseudoephedrin eingesetzt. Die spektroskopischen Daten waren identisch mit (**66**) mit Ausnahme des Drehwerts: $[\alpha]_D^{20} = -96.2^\circ$ (c = 0.8, MeOH).

13.1.2 Synthese von (*S,S,R*)-Pseudoephedrin-allylglycinamid (**67**) und (*R,R,S*)-Pseudoephedrin-allylglycinamid (**ent-67**)



In einem Dreihalskolben wurde LiCl (17.04 g, 0.403 mol) vorgelegt. Der Kolben wurde evakuiert und das LiCl weiter unter Hitze getrocknet. Nach dem Abkühlen wurde mehrfach mit Argon gespült und der Kolben mit einem Tropftrichter ausgestattet. Es wurden 300 ml THF zugesetzt. Um eine homogene Verteilung zu garantieren, wurde die Suspension 20 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Im leichten Argongegenstrom erfolgte die portionsweise Zugabe (ca. 8 Portionen) des

(S,S)-Pseudoephedrin-glycinamid-Hydrats über einen Zeitraum von 10 Minuten, anschließend wurde der Dreihalskolben mit einem Thermometer ausgestattet. Die Suspension löste sich hierbei langsam auf. Das Reaktionsgemisch wurde mittels eines Eisbads auf 0 °C gekühlt. Währenddessen wurde das Lithiumhexamethyldisilazid (1M in THF, 323 ml, 0.323 mol) unter Argonatmosphäre mit einer Kanüle in den Tropftrichter überführt. Zunächst erfolgte die tropfenweise Zugabe von 1.5 eq LiHMDS (152 ml) derart, daß die Temperatur des Reaktionsgemisches unter 3 °C verblieb. Das Reaktionsgemisch wurde dann wieder auf 0°C abgekühlt und die restlichen 1.7 eq LiHMDS (171 ml) unter starkem Rühren komplett auf einmal hinzugegeben. Diese Methode ist für eine erfolgreiche Umsetzung essentiell. Nach 30 Minuten Rühren bei 0 °C erfolgte die langsame Zugabe (15 Minuten) des Allylbromids (9.1 ml, 0.106 mol) zum orange-farbenen Enolat. Das Reaktionsgemisch wurde für eine weitere Stunde bei 0 °C gerührt. Zum Aufarbeiten wurden 250 ml Wasser zugegeben und das Zweiphasen-Gemisch vorsichtig mit 6M HCl auf pH 0 eingestellt. Das Gemisch wurde mehrfach mit AcOEt ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden jeweils einmal mit: 3M HCl, 1M HCl und Wasser reextrahiert. Diese wäßrigen Phasen wurden mit der zuvor separierten vereinigt und im Eisbad auf 0 °C gekühlt. Durch vorsichtige Zugabe von 50%iger NaOH-Lauge wurde der pH-Wert auf 14 eingestellt. Die wäßrige Lösung wurde mehrfach mit CH₂Cl₂ ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden über K₂CO₃ getrocknet. Nach Abzug des Lösungsmittels im Vakuum wurde das Rohprodukt über Nacht lyophilisiert. Das zurückbleibende gelbliche hochviskose Öl wurde in 70 ml heißem Toluol aufgenommen. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Produkt bei -20 °C über Nacht auskristallisiert. Der farblose Feststoff wurde separiert und mit einer Portion eiskaltem Toluol, gefolgt von vier Portionen eiskaltem Diethylether gewaschen. Nach Trocknen im Vakuum erhielt man 65 % (17.34 g) (**67**) in Form farbloser Kristalle. Die Mutterlauge wurde aufkonzentriert und nochmals kristallisiert und erbrachte weitere 5 % Produkt.

DC: $R_f = 0.65$ (CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ 10:1:0.5);

Schmelzpunkt: 79-82 °C,^[88]

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = +67.2$ (c = 0.7, MeOH);

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.36-7.24 (m, 5H), 5.76-5.65 (m, 1H), 5.19-5.07 (m, 2H), 4.62-4.47 (m, 1H), 4.47-4.40 (m, 1H), 3.74-3.63 (m, 1H), 2.94 (s*, 3H), 2.87 (s*), 2.34-2.03 (m, 2H), 1.08 (d*, J = 6.9 Hz, 3H), 0.98 (d*, J = 6.7 Hz, 3H);

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3369, 3354, 3190, 3078, 2988, 2940, 1619, 544, 1492, 1455, 1423, 1377, 1321, 1264, 1206, 1176, 1105, 1079, 1060, 1011, 955, 946, 912, 857, 839, 796, 758, 741, 706, 639, 616, 562;

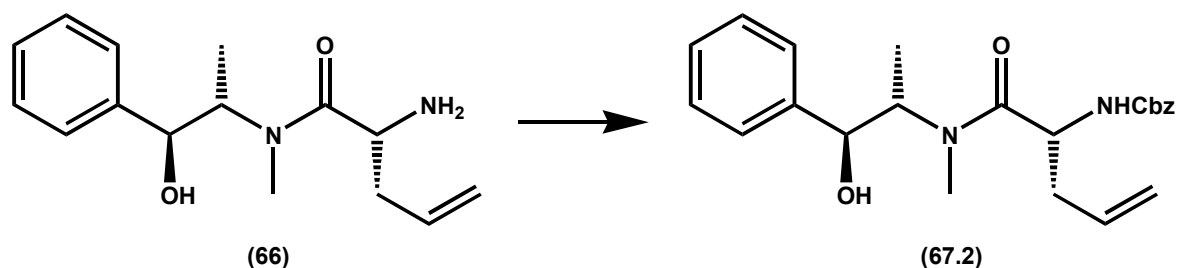
Elementaranalyse: $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2$ (262.17)

Berechnet (%): C 68.67, H 8.45, N 10.68;

Gefunden (%): C 68.52, H 8.42, N 10.78.

Die Synthese des (*R,R,S*)-Pseudoephedrin-Allylglycinamids (**ent-67**) erfolgte analog zur oben beschriebenen Methode. Die spektroskopischen Daten waren identisch mit (**67**) mit Ausnahme des Drehwerts: $[\alpha]_D^{20} = -67.3^\circ$ ($c = 0.7$, MeOH).

13.1.3 Synthese von N-Cbz-(*S,S,R*)-Pseudoephedrin-allylglycinamid (**67.2**):



Das Allylglycinderivat (**66**) (15.0 g, 57 mmol) wurde in CHCl_3 (250 ml) gelöst. Nach tropfenweiser Zugabe von EtN_3 (9.56 ml, 69 mmol) wurde das Gemisch 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend auf 0°C abgekühlt. Es erfolgte die Zugabe von Cbz-Cl (9.67 ml, 69 mmol). Man ließ das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur erwärmen und weitere 18 h rühren. Zur Aufarbeitung wurde gesättigte NaHCO_3 -Lösung (100 ml) hinzugegeben und das Gemisch weitere 20 Minuten gerührt. Die organische Phase wurde isoliert und mit gesättigter NaHCO_3

(100 ml) extrahiert. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden mit CH_2Cl_2 (2 x 100 ml) reextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden vom Lösungsmittel befreit und das gelbliche Öl mittels Gradienten Säulen Chromatographie aufgereinigt (AcOEt/Hex 1/1, AcOEt), wobei das Produkt in Form eines schwach gelben, hochviskosen Öls mit einer Ausbeute von 96 % (21.68 g) isoliert werden konnte.

DC: $R_f = 0.5$ (AcOEt/Hex 1/1);

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = +53.9^\circ$ (c = 0.3, MeOH);

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta = 7.54$ (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.53–7.23 (m, 10H), 5.91–5.69 (m, 1H), 5.26–4.94 (m, 4H), 4.69–4.46 (m, 2H), 4.17–4.00 (m, 1H), 2.82 (s*, 3H), 2.46–2.24 (m, 2H), 0.83 (d*, $J = 6.6$ Hz, 3H);

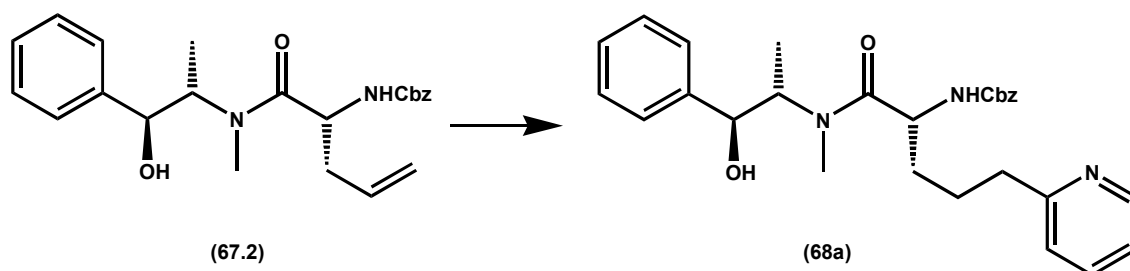
IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3416, 3032, 1717, 1630, 1508, 1455, 1411, 1253, 1112, 1049, 919, 756, 700$;

Elementaranalyse: $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_4$ (396.47)

Berechnet (%): C 69.67, H 7.12, N 7.07;

Gefunden (%): C 69.42, H 7.01, N 6.92.

13.1.4 Synthese von N-Cbz-(S,S,R)-Pseudoephedrin-2-pyridyl-propylglycinamid (68a)



Das Allylderivat **(67.2)** (2.0 g, 5.1 mmol) wurde unter Argon-Atmosphäre mit 9-BBN (24.3 ml; 0.5 M in THF, 12.2 mmol) versetzt und bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Abreagieren des Eduktes (15 min., EE/Hex 1:1, Startfleck) wurden im Argongegenstrom $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (291 mg, 5 mol %) und 3 M wässrige K_3PO_4 -Lösung (5 ml) zugegeben. Abschließend erfolgte die Zugabe von 2-Brompyridin (517 μL , 5.3 mmol). Das Reaktionsgemisch wurde 16 h bei Raumtemperatur gerührt, anschließend mit Et_2O (10 ml) verdünnt und viermal mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung extrahiert. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden zweimal mit Et_2O (20 ml) reextrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen und der verbleibende Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel aufgereinigt (Gradient: AcOEt/Hex 1/1, AcOEt). Das Produkt **(68a)** konnte als farbloser Schaum mit einer Ausbeute von 2.19 g (90 %) isoliert werden.

DC: $R_f = 0.5$ (DCM/MeOH 20/1);

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = +56.5^\circ$ ($c = 0.1$, MeOH);

$^1\text{H-NMR}$: (250 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta = 8.5\text{--}7.2$ (m, 15H), 5.50 (d, 1H, $J = 3.7$ Hz), 5.07–4.93 (m, 2H), 4.58–4.47 (m, 2H), 4.14–4.05 (m, 1H), 2.84–2.65 (m, 5H), 1.77–1.44 (m, 4H), 0.82 (d*, 3H, $J = 6.4$ Hz);

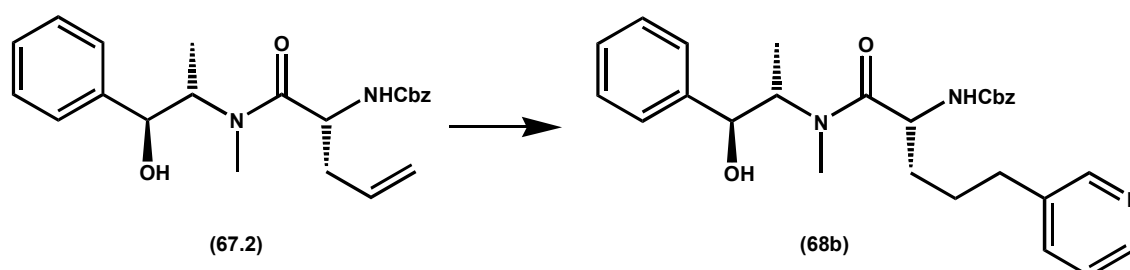
IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3402, 3287, 3062, 3031, 2935, 2863, 1715, 1630, 1528, 1496, 1477, 1454, 1436, 1409, 1247, 1119, 1050, 1027, 911, 838, 753, 700, 612$;

Elementaranalyse $C_{28}H_{33}N_3O_4$ (480,65) $\times 0.3 H_2O$

Berechnet (%): C 69.92, H 7.04, N 8.74;

Gefunden (%): C 69.97, H 7.11, N 8.39.

13.1.5 Synthese von N-Cbz-(S,S,R)-Pseudoephedrin-3-pyridyl-propylglycinamid (**68b**)



Die Synthese erfolgte analog zur Verbindung (**68a**). Es wurden eingesetzt:

Edukt	Menge
(S,S)-Cbz-Allylamid (67.2)	4.0 g, 10.08 mmol
9-BBN in THF (0.5M)	48.3 ml, 24.19 mmol
$Pd(PPh_3)_4$	582 mg, 5 mol%
K_3PO_4 (3M)	10,08 ml
3-Brompyridin	1.1 ml, 10.58 mmol

Das Produkt (**68b**) wurde in Form eines hellen Schaums mit einer Ausbeute von 38 % (1.82 g) isoliert.

DC: $R_f = 0.5$ (DCM/MeOH 20/1);

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = +53.3^\circ$ (c = 0.6, MeOH);

1H -NMR: (250 MHz, $[D_6]DMSO$): $\delta = 8.48$ – 8.37 (m, 1H), 7.66 – 7.18 (m, 13 H), 5.51 (d, 1H, $J = 3.7$ Hz), 5.09 – 4.91 (m, 2H), 4.62 – 4.37 (m, 2H), 4.19 – 4.07 (m, 1H), 2.88 – 2.52 (m, 5H), 1.66 – 1.35 (m, 4H), 0.83 (d*, $J = 6.3$ Hz, 3H);

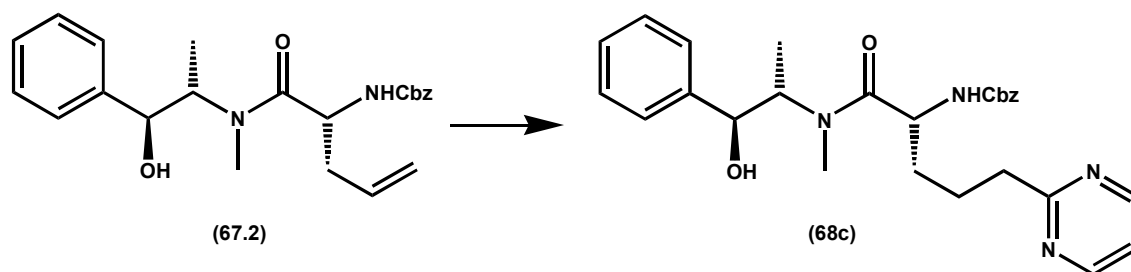
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3406, 2933, 1718, 1629, 1528, 1456, 1412, 1351, 1245, 1116, 1049, 755, 700, 611;

Elementaranalyse: C₂₈H₃₃N₃O₄ x 0.95 eq AcOEt (558.95)

Berechnet: C 68.29, H 7.32 N 7.51;

Gefunden: C 68.02, H 7.02, N 7.77.

13.1.6 Synthese von N-Cbz-(S,S,R)-Pseudoephedrin-2-pyrimidinyl-propylglycinamid (68c)



Die Synthese erfolgte analog zur Verbindung **(68a)**. Es wurden eingesetzt:

Edukt	Menge
(S,S)-Cbz-Allylamid (67.2)	3.0 g, 7.57 mmol
9-BBN in THF (0.5M)	36 ml, 18.2 mmol
Pd(PPh ₃) ₄	437 mg, 5 mol%
K ₃ PO ₄ (3M)	7.5 ml
2-Brompyrimidin	1.26 g, 7.95 mmol

Das Produkt **(68c)** wurde in Form eines farblosen Schaums mit einer Ausbeute von 88 % (3.16 g) isoliert.

DC: R_f = 0.5 (DCM/MeOH 20/1);

Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = +58.1° (c = 0.5, MeOH);

¹H-NMR: (250 MHz, [D₆]DMSO): 8.72 (dd, 2H, J = 4.9/4.1 Hz), 7.55–7.27 (m, 12 H, J = 4.9 Hz), 5.48 (d, 1H, J = 3.7 Hz), 5.07–4.93 (m,

2H), 4.75–4.65 (m, 2H), 4.18–4.00 (m, 1H), 2.90–2.78 (m, 5H), 1.85–1.50 (m, 4H), 0.83 (d*, 3H, $J = 6.5$ Hz);

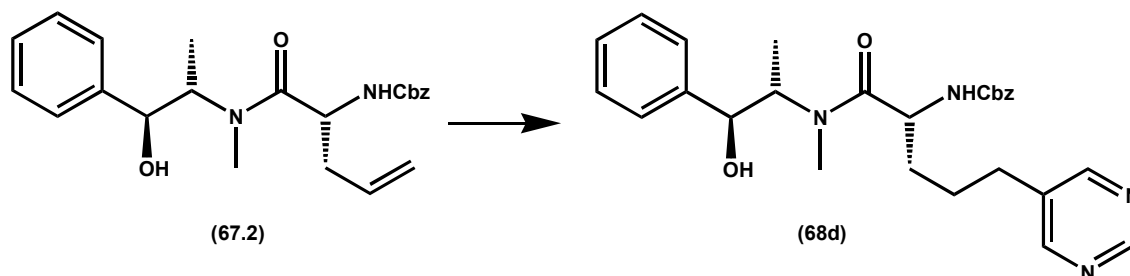
IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3336, 3063, 2936, 1711, 1639, 1561, 1529, 1491, 1453, 1423, 1376, 1249, 1199, 1101, 1046, 912, 818, 754, 698, 636, 582$;

Elementaranalyse: $C_{27}H_{32}N_4O_4 \times 0.50$ eq H_2O (485.24)

Berechnet: C 66.79, H 6.85, N 11.54;

Gefunden: C 66.95, H 6.87, N 11.21.

13.1.7 Synthese von N-Cbz-(S,S,R)-Pseudoephedrin-5-pyrimidinyl-propylglycinamid (**68d**)



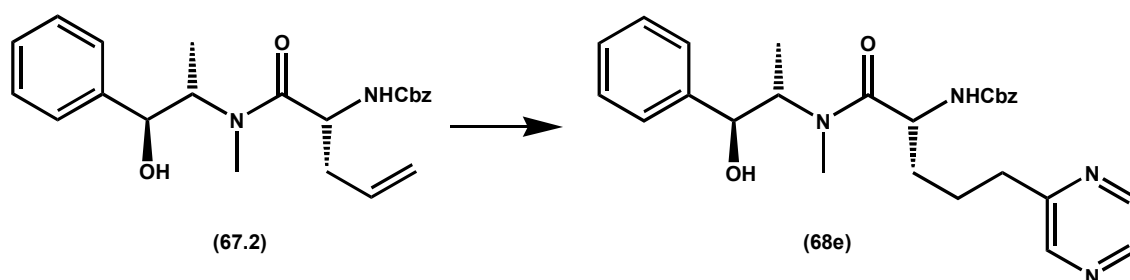
Die Synthese erfolgte analog zur Verbindung (**68a**). Es wurde eingesetzt:

Edukt	Menge
(S,S)-Cbz-Allylamid (67.2)	5.0 g, 12.6 mmol
9-BBN in THF (0.5M)	60.5 ml, 30.2 mmol
$Pd(PPh_3)_4$	728 mg, 5 mol%
K_3PO_4 (3M)	12.6 ml
5-Brompyrimidin	2.10 g, 13.23 mmol

Das Produkt (**68d**) wurde in Form eines hellen Schaums mit einer Ausbeute von 27 % (1.62 g) isoliert.

- DC: $R_f = 0.5$ (DCM/MeOH 20/1);
- Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = +61.2^\circ$ ($c = 0.5$, MeOH);
- $^1\text{H-NMR}$: (250 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): 9.04 (d, 1H, $J = 1.9$ Hz), 8.66 (m, 2H), 7.42–7.24 (m, 11H), 5.57 (d, 1H, $J = 4.1$ Hz), 5.08–4.93 (m, 2H), 4.62–4.41 (m, 2H), 4.18–4.00 (m, 1H), 2.88–2.52 (m, 5H), 1.69–1.41 (m, 4H), 0.83 (d*, 3H, $J = 6.6$ Hz);
- IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3396, 3291, 3031, 2936, 2866, 1713, 1632, 1563, 1530, 1496, 1454, 1410, 1375, 1250, 1122, 1049, 911, 838, 756, 728, 701, 635, 612$;
- Masse MS (ESI): $[\text{M}+\text{H}^+]$ ($\text{C}_{27}\text{H}_{33}\text{N}_4\text{O}_4$)
- Berechnet: 477.2502;
- Gefunden: $m/z = 477.2345$ $[\text{M}+\text{H}^+]$.

13.1.8 Synthese von N-Cbz-(S,S,R)-Pseudoephedrin-pyrazinyl-propylglycinamid (68e)



Die Synthese erfolgte analog zur Verbindung **(68a)**. Es wurde eingesetzt:

Edukt	Menge
(S,S)-Cbz-Allylamid (67.2)	5.0 g, 12.6 mmol
9-BBN in THF (0.5M)	60.5 ml, 30.2 mmol
$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$	728 mg, 5 mol%
K_3PO_4 (3M)	12.6 ml
Chlorpyrazin	1.2 ml, 13.23 mmol

Das Produkt **(68e)** wurde in Form eines hellen Schaums mit einer Ausbeute von 86 % (5.16 g) isoliert.

DC: $R_f = 0.5$ (DCM/MeOH 20/1);

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = +58.2^\circ$ ($c = 0.5$, MeOH);

$^1\text{H-NMR}$: (250 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): 8.60–8.50 (m, 2H, $J = 2.5$ Hz), 8.48 (d, 1H, $J = 2.5$ Hz), 7.60–7.25 (m, 12H), 5.50 (d, 1H, $J = 3.7$ Hz), 5.35–4.90 (m, 2H), 4.75–4.45 (m, 2H), 4.20–4.05 (m, 1H), 2.90–2.65 (m, 5H), 1.85–1.40 (m, 4H), 0.83 (d*, 3H, $J = 6.5$ Hz);

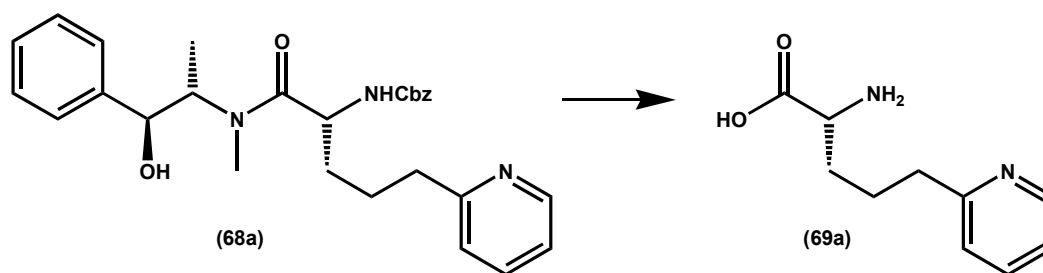
IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3407, 3062, 2934, 1718, 1636, 1526, 1497, 1476, 1456, 1405, 1245, 1120, 1050, 1017, 912, 836, 757, 700, 610$;

Elementaranalyse: $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_4 \times 0.45 \text{ eq H}_2\text{O}$ (484.34)

Berechnet: C 66.91, H 6.84 N 11.56;

Gefunden: C 66.95, H 6.75, N 11.36.

13.1.9 Synthese von (*R*)-2-Pyridyl-propylglycin (**69a**)



Das 2-Pyridyl-Derivat **(68a)** (5.9 g, 12.4 mmol) wurde in MeOH (20 ml) gelöst. Nach mehrfachem Spülen des Kolbens mit Argon wurde Pd/C (10 %, 700 mg) hinzugegeben. Der Kolben wurde anschließend unter Wasserstoff-Atmosphäre gesetzt und für 16–24 h (abhängig von der Aktivität des Katalysators) bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde über Celite® abfiltriert, mit MeOH gewaschen und die resultierende organische Phase einrotiert. Der verbleibende ölige Rückstand wurde in Wasser (40 ml) suspendiert und das Reaktionsgemisch zur Abspaltung des

Auxilliars für 24 h zum Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Gemisch fünfmal mit DCM extrahiert. Die wässrige Phase wurde im Vakuum aufkonzentriert und der verbleibende ölige Rückstand aus MeOH/AcOEt/Hexan/Et₂O umkristallisiert. Es konnten 1.5 g (62 % über 2 Stufen) Produkt in Form eines farblosen Feststoffs isoliert werden.

DC: $R_f = 0.2$ (H₂O); m.p. 192°C;

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = +7.0^\circ$ (c = 0.4, MeOH);

¹H-NMR: (250 MHz, [D₆]DMSO): 8.39–8.33 (m, 1H), 7.76–7.69 (m, 1H), 7.39–7.19 (m, 2H), 3.73–3.64 (m, 1H), 2.84–2.70 (m, 2H), 1.87–1.66 (m, 4H);

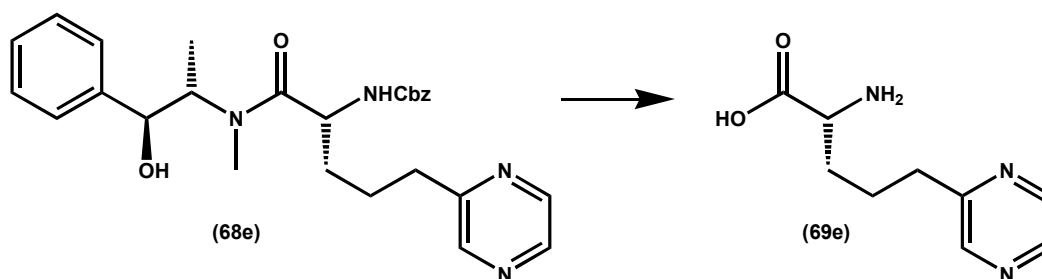
IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3017, 2934, 2862, 2594, 2112, 1631, 1587, 1520, 1477, 1459, 1439, 1406, 1352, 1308, 1232, 1201, 1157, 1129, 1065, 1050, 1015, 998, 882, 846, 827, 784, 755, 737, 671, 634, 605$;

Elementaranalyse: C₁₀H₁₄N₂O₂ x 0.3 eq MeOH (203.72)

Berechnet: C 60.69, H 7.52, N 13.74;

Gefunden C 60.81, H 6.75, N 13.68.

13.1.10 Synthese von (*R*)-Pyrazinyl-propylglycin (**69e**)



Die Synthese erfolgte analog zur Verbindung (**69a**). Es wurde eingesetzt:

Edukt	Menge
Pyrazinyl-Derivat (68e)	4.7 g, 9.84 mmol
Pd/C	400 mg
MeOH	20 ml
H ₂ O (2. Stufe)	30 ml

Das Produkt (**69e**) wurde in Form eines hautfarbener Feststoff mit einer Ausbeute von 63 % (1.21 g, über 2 Stufen) isoliert.

DC: $R_f = 0.4$ (H₂O);

Schmelzpunkt: 246 °C;

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = +3.9^\circ$ (c = 0.3, MeOH);

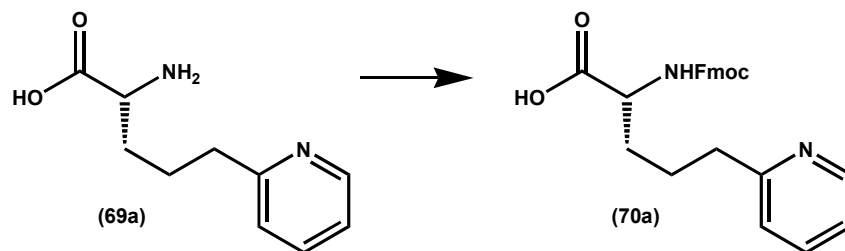
¹H-NMR: (250 MHz, [D₆]DMSO): 8.49 (d, *J* = 3.6 Hz, 2H), 8.41 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 3.40–3.35 (m, 1H), 2.79–2.74 (m, 2H), 1.80–1.61 (m, 4H);

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3444, 3042, 2956, 2602, 2133, 1584, 1519, 1407, 1355, 1355, 1327, 1161, 1134, 1062, 1019, 828, 670$;

Elementaranalyse: C₉H₁₃N₃O₂ (195.10)

Berechnet: C 55.37, H 6.71, N 21.52;

Gefunden: C 55.41, H 6.72, N 21.33.

13.1.11 Synthese von N-Fmoc-(*R*)-2-Pyridyl-propylglycin (70a)

69a (500 mg, 2.57 mmol) wurde in Argon-Atmosphäre in DCM suspendiert (15 ml) und TMS-Cl (651 μ L, 5.15 mmol) mittels einer Spritze langsam zugetropft. Innerhalb von 30 min. löste sich die Suspension zu einer klaren, schwach gelben Lösung auf. An dieser Stelle wurde DIPEA (761 μ L, 4.45 mmol), gefolgt von Fmoc-Cl (665 mg, 2.57 mmol) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 16 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit 2.5 %iger wässriger NaHCO_3 -Lösung (15 ml) und Et_2O (15 ml) verdünnt. Die wässrige Phase wurde viermal mit Et_2O extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurde mit 2.5 %iger wässriger NaHCO_3 -Lösung (20 ml) gefolgt von Wasser (20 ml) reextrahiert. Die wässrigen Phasen wurden vereinigt und mit 1M HCl vorsichtig auf pH 1 angesäuert. Während des Ansäuerns wurde die Lösung milchig. Diese wurde dann achtmal mit AcOEt (50 ml) extrahiert. Die organische Phase wurde im Vakuum aufkonzentriert, wobei ein bräunlicher Schaum zurückblieb. Dieser wurde unter Erwärmen in AcOEt aufkonzentriert und die organische Phase vom bräunlichen Rückstand separiert. Nach Abzug des Lösungsmittels wurde der verbleibende Schaum mit AcOEt/MeOH/Hexan/ Et_2O umkristallisiert, wobei das Produkt in Form eines hautfarbenen Puders mit einer Ausbeute von 860 mg (80 %) isoliert werden konnte.

DC: $R_f = 0.5$ (MeOH);

Schmelzpunkt: 108–110 $^{\circ}\text{C}$;

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = +1.7^{\circ}$ ($c = 0.2$, Methanol);

$^1\text{H-NMR}$: (250 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): 12.8–12.2 (bs, 1H), 8.49 (d, 1 H, $J = 4.1$ Hz), 7.91–7.20 (m, 12H), 4.31–4.23 (m, 3H), 4.15–3.95 (m, 1H), 2.74 (d, 2H, $J = 5.9$ Hz), 1.50–1.81 (m, 4H);

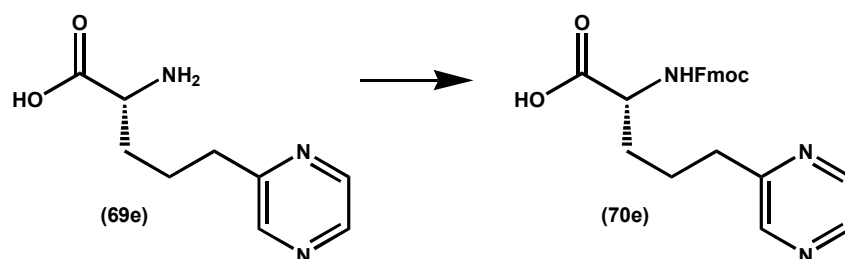
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3556, 2959, 2490, 1960, 1697, 1599, 1538, 1449, 1334, 1301, 1235, 1155, 1110, 1082, 1055, 1012;

Elementaranalyse: C₂₅H₂₄N₂O₄ x 1.3 eq H₂O (440.57)

Berechnet: C 68.26, H 6.09, N 6.37;

Gefunden: C 68.21, H 5.83, N 6.55.

13.1.12 Synthese von N-Fmoc-(*R*)-D-Pyrazinyl-propylglycin (**70e**) und N-Fmoc-(*S*)-L-Pyrazinyl-propylglycin (**ent-70e**)



Die Synthese erfolgte analog zur Verbindung (**70a**). Es wurde eingesetzt:

Edukt	Menge
Pyrazinyl-Derivat (69e)	500 mg, 2.56 mmol
TMSCl	648 μ l, 5.13 mmol
DIPEA	758 μ l, 4.43 mmol
Fmoc-Cl	662 mg, 2.56 mmol
CH ₂ Cl ₂	20 ml

Das Produkt (**69e**) wurde in Form eines hellen, z. T. kristallisierenden Schaums mit einer Ausbeute von 68 % (725 mg) isoliert.

DC: R_f = 0.5 (MeOH);

Schmelzpunkt: 89-90°C;

Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = +1.5° (c = 0.3, MeOH);

$^1\text{H-NMR}$: (250 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): 12.53 (bs, 1H), 8.56 (s, 2H), 8.49 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 7.91–7.29 (m, 10H), 4.32–4.20 (3H), 4.15–3.85 (m, 1H), 2.85–2.70 (m, 2H), 1.85–1.61 (m, 4H);

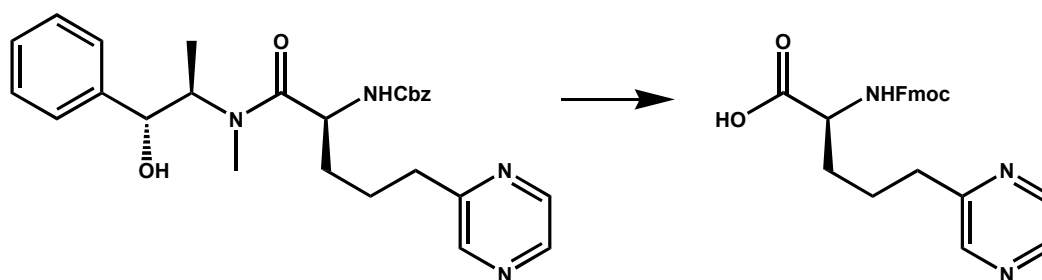
IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3320, 3064, 2926, 2863, 2519.4, 1924, 1718, 1691, 1608, 1542, 1476, 1450, 1404, 1372, 1258, 1160, 1050, 9889, 861, 758, 733, 660, 621$;

Elementaranalyse: $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_4$ (416.17)

Berechnet: C 69.05, H 5.55, N 10.07;

Gefunden: C 68.84, H 5.76, N 9.82.

N-Fmoc-(S)-L-Pyrazinyl-propylglycin (ent-70e):



Die Synthese erfolgte analog zur Verbindung **(70a)**. Es wurde eingesetzt:

Ausbeute: 67 %;

DC: $R_f = 0.5$ (MeOH);

Schmelzpunkt: 87-90°C;

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = -1.4^\circ$ ($c = 0.4$, MeOH);

NMR- und IR-Spektren waren identisch mit den Daten von Verbindung **70e**;

Elementaranalyse: $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_4 \times 0.5$ eq AcOEt (460.23)

Berechnet: C 67.67, H 5.90, N 9.10

Gefunden: C 67.60, H 5.86, N 9.35.

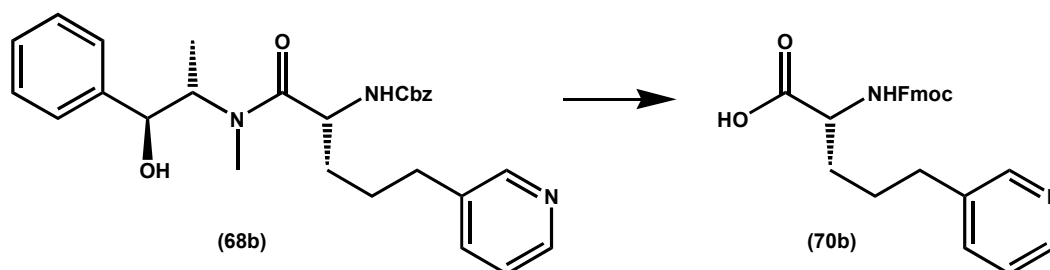
Bestimmung des Enantiomerenüberschusses über HPLC:

Säule: Daicel Chiralcel OJ-R 150 x 4.6 mm; E

Eluent: wäßrige 0.1% Trifluoressigsäure - Acetonitril 73 : 27;

flow rate 0.5 mL/min; Detektion: UV, 254 nm;

Retentionszeit (ent-**70e**): 42.19 min, Retentionszeit **70e**: 47.73 min.

13.1.13 Synthese von N-Fmoc-(R)-D-3-Pyridyl-propylglycin (70b)

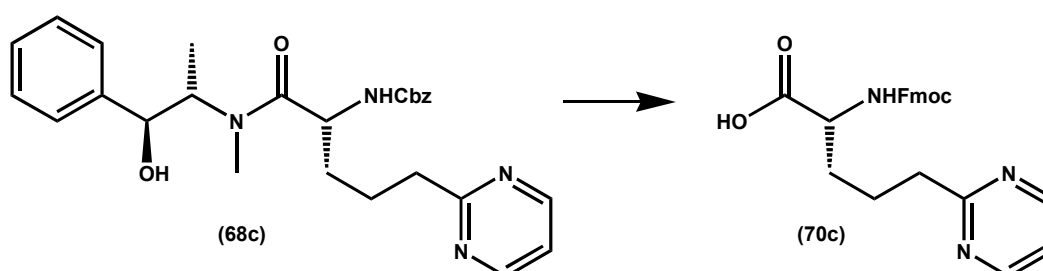
Die Cbz-Schutzgruppe des Derivats **(68b)** (2.1 g, 4.39 mmol) wurde durch Hydrierung mit Pd/C (10 %, 300 mg) entfernt. Das verbleibende Öl wurde in H₂O (30 ml) suspendiert und das Gemisch für 24 h refluxiert. Das Pseudoephedrin konnte durch Extraktion mit CH₂Cl₂ abgetrennt werden. Die wäßrige Phase wurde mittels Rotationsverdampfer aufkonzentriert und der verbleibende Rückstand im Vakuum getrocknet. Die Aminosäure wurde ohne weitere Aufreinigung nach der Methode wie für **(70a)** beschrieben Fmoc-geschützt. Es wurden eingesetzt:

Edukt	Menge
TMSCl	1.04 ml, 8.24 mmol
DIPEA	1.22 ml, 7.13 mmol
Fmoc-Cl	451 mg, 4.12 mmol
CH ₂ Cl ₂	20 ml

Das Produkt **(70b)** wurde in Form eines farblosen Schaums mit einer Ausbeute von 50 % (906 mg, über 3 Stufen) isoliert.

DC:	$R_f = 0.5$ (MeOH);
Drehwert:	$[\alpha]_D^{20} = +3.4^\circ$ (c= 0.3, MeOH);
$^1\text{H-NMR}$:	(250 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): 12.8–12.2 (bs, 1H), 8.48 (dd, $J = 7.2/2.2$ Hz, 1H), 7.90 (bd, 2H), 7.76–7.26 (m, 9H), 4.35–4.18 (m, 3H), 4.05–3.93 (m, 1H), 2.73–2.57 (m, 2H), 1.82–1.52 (m, 4H);
IR (KBr):	$\tilde{\nu} = 3323, 3063, 2937, 1718, 1534, 1450, 1400, 1332, 1245, 1048, 761, 740$;
Masse MS (ESI):	$[\text{M}+\text{H}^+]$ ($\text{C}_{25}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_4$)
Berechnet:	417.1814;
Gefunden:	$m/z = 417.1677$ $[\text{M}+\text{H}^+]$.

13.1.14 Synthese von N-Fmoc-(*R*)-D-2-Pyrimidinyl-propylglycin (70c)



Die Synthese erfolgte analog zur Verbindung (**70b**). Es wurde eingesetzt:

Reakt.	Edukt	Menge
1	2-Pyrimidinyl-Derivat (68c)	2.8 g, 5.86 mmol
	Pd/C	400 mg
	MeOH	20 ml
2	H ₂ O	30 ml
3	TMSCl	881 μl , 6.97 mmol
	DIPEA	1.03 ml, 6.04 mmol
	Fmoc-Cl	967 mg, 3.74 mmol
	CH ₂ Cl ₂	20 ml

Das Produkt (**70c**) wurde in Form eines hellen Schaums mit einer Ausbeute von 32 % (782 mg) isoliert.

DC: $R_f = 0.5$ (MeOH);

Schmelzpunkt: 60-64°C;

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = +1.9^\circ$ (c = 0.3, MeOH);

$^1\text{H-NMR}$: (250 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): 12.9–12.2 (bs, 1H), 8.73 (d, 2 H, $J = 5.1$ Hz), 7.92–7.30 (m, 11H), 4.33–4.20 (m, 3H), 4.08–3.93 (m, 1H), 2.92–2.86 (m, 2H), 1.92–1.57 (m, 4H);

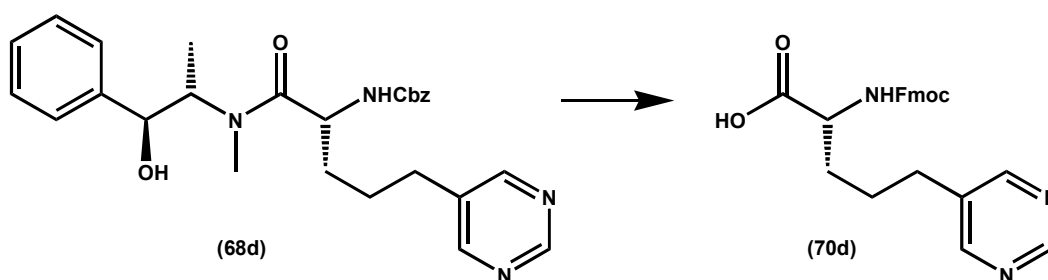
IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3405, 3039, 2950, 1718, 1561, 1540, 1527, 1450, 1424, 1340, 1247, 1106, 1052, 760, 741$;

Elementaranalyse: $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_4 \times 1 \text{ eq AcOEt}$ (505.56)

Berechnet: C 66.52, H 6.18, N 8.31;

Gefunden: C 66.57, H 6.12, N 8.46.

13.1.15 Synthese von N-Fmoc-(R)-D-5-Pyrimidinyl-propylglycin (**70d**)



Die Synthese erfolgte analog zur Verbindung (**70b**). Es wurde eingesetzt:

Reakt.	Edukt	Menge
1	5-Pyrimidinyl-Derivat (68d)	4.83 g, 10.1 mmol
	Pd/C	600 mg
	MeOH	30 ml
2	H ₂ O	40 ml
3	TMSCl	1.34 ml, 10.66mmol
	DIPEA	1.5 ml, 9.2 mmol
	Fmoc-Cl	1.29 g, 5 mmol
	CH ₂ Cl ₂	30 ml

Das Produkt (**70d**) wurde in Form eines hellen Schaums mit einer Ausbeute von 40 % (1.68 g, über drei Stufen) isoliert.

DC: $R_f = 0.5$ (MeOH);

Schmelzpunkt: 78-80°C;

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = +3.5^\circ$ (c= 0.3, MeOH);

¹H-NMR: (250 MHz, [D₆]DMSO): 12.5–12.2 (bs, 1H), 9.05 (s, 1H), 8.68 (s, 2H), 7.93–7.25 (m, 10H), 4.34–4.18 (m, 3H), 4.06–3.92 (m, 1H), 2.68–2.56 (m, 2H), 1.76–1.57 (m, 4H);

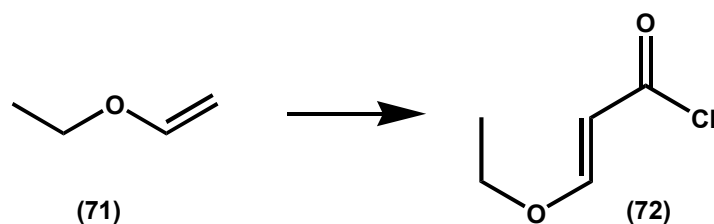
IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3396, 3040, 2948, 2368, 1718, 1522, 1449, 1410, 1321, 1218, 1052, 760, 740, 646$;

Masse MS (ESI) : [M+H⁺] (C₂₅H₂₄N₂O₄)

Berechnet: 418.1767;

Gefunden: $m/z = 418.1716$ [M+H⁺].

13.1.16 Synthese von (E)-3-Ethoxyacryloylchlorid

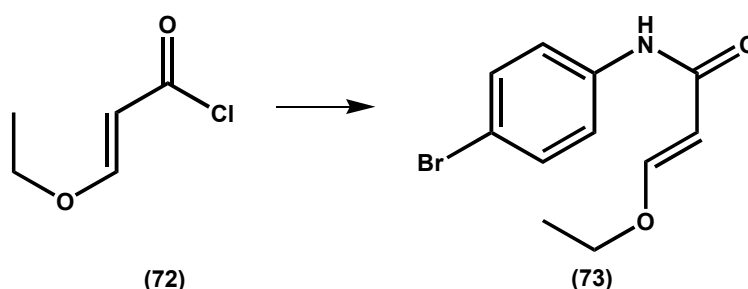


Das Oxalylchlorid (51.6 ml, 0.6 mol) wurde in einem Dreihalskolben unter Argonatmosphäre vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Hierzu wurde der Vinylether (38.3 ml, 0.4 mol) langsam zugetropft. Nach beendeter Zugabe ließ man das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur erwärmen und es wurde weitere 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Das überschüssige Oxalylchlorid wurde mittels einer Vigreux-Kolonne bei 35 °C abdestilliert. Zur Decarbonylierung wurde das Gemisch auf 130 °C erhitzt, wobei über einen Blasenähler eine rege Gasentwicklung von CO zu beobachten war. Nach beendeter Reaktion (ca. 30 min) wurde das Reaktionsgemisch zunächst auf Raumtemperatur abgekühlt und das Produkt unter Vakuum (3.4 mbar, Siedepunkt 55 °C) abdestilliert. Es konnten 35.90 g Produkt (67 %) in Form einer klaren Flüssigkeit isoliert werden, das nach NMR-spektroskopischer Untersuchung sofort weiter umgesetzt wurde.

Siedepunkt: 55°C bei 3.4 mbar;

¹H-NMR: (250 MHz, CDCl₃): 7.71 (d, J=12 Hz, 1H), 5.43 (d, J=12 Hz, 1H), 3.98 (q, J=7 Hz, 2H), 1.32 (t, J=7 Hz, 3H).

Die spektroskopischen Daten waren identisch mit der Literatur.^[98]

13.1.17 Synthese von N-(4-Bromphenyl)-(E)-3-ethoxyacrylamid (73)

p-Bromanilin (27.7 g, 0.16 mol) und absolutiertes Pyridin (25 ml) wurden zusammen mit absolutiertem CH_2Cl_2 (250 ml) unter Argonatmosphäre vorgelegt. Das (E)-3-Ethoxyacryloylchlorid (25.19 g, 0.188 mol) wurde zu dieser Lösung gegeben und das Gemisch eine Stunde lang bei Raumtemperatur gerührt. Es fiel ein gelber Feststoff aus, der isoliert wurde. Eine Aufreinigung erfolgte durch Umkristallisation aus AcOEt und Hexan. Man erhielt einen hellen Feststoff mit einer Ausbeute von 60 % (25.82 g).

DC: $R_f = 0.45$ (Hexan/EtOAc 2/1);

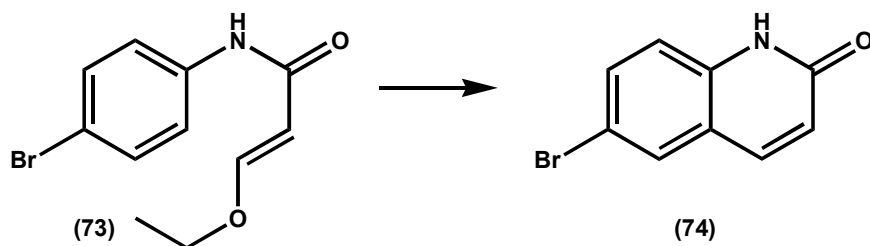
Schmelzpunkt: $165\text{--}167\text{ }^\circ\text{C}$,^[98]

$^1\text{H-NMR}$: (250 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): 9.85 (s, 1H), 7.61–7.44 (m, 5H), 5.51 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H), 3.96 (q, $J = 7$ Hz, 2H), 1.27 (t, $J = 7$ Hz, 3H);

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3243, 3085, 3006, 2974, 2940, 2892, 2850, 2769$;

Die spektroskopischen Daten waren identisch mit der Literatur.^[98]

13.1.18 Synthese von 6-Brom-1H-chinolin-2-on



Schwefelsäure (80 ml) wurde in einem Kolben vorgelegt und mit dem Eisbad auf 0 °C gekühlt. Unter Rühren wurde langsam N-(4-Bromphenyl)-(E)-3-ethoxyacrylamid (8 g, 0.030 mol) hinzugegeben. Anschließend wurde das Eisbad entfernt und für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsansatz wurde langsam auf Eis gegeben, wobei ein weißer Feststoff ausfiel. Dieser wurde isoliert und ausgiebig mit H₂O gewaschen. Man erhielt das Produkt mit einer Ausbeute von 80 % in Form eines weißen, kristallinen Feststoffs (5.37 g).

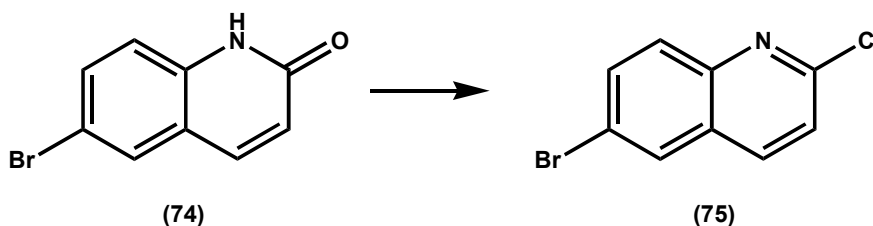
DC: $R_f = 0.59$ (CH₂Cl₂/MeOH 9:1);

Schmelzpunkt: 165-167 °C; ^[98]

¹H-NMR: (250 MHz, [D₆]DMSO): 11.88 (s, 1H), 7.94–7.87 (m, 2H), 7.66 (dd, $J = 8.7$ Hz, $J = 2.2$ Hz, 1H), 7.26 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 6.65 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H);

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3132, 2994, 2883, 1682, 1636, 1611, 1597, 1554, 1481, 1425, 1297, 1241, 1277, 1256, 1201, 1156, 1138, 1071, 944, 926, 888, 855, 807, 741, 682, 638, 594$;

Die spektroskopischen Daten waren identisch mit der Literatur.^[98]

13.1.19 Synthese von 6-Brom-2-chlorchinolin

6-Brom-1H-chinolin-2-on (1.5 g, 6.69 mmol) **(74)** wurden in einem Kolben vorgelegt und das POCl_3 (5.4 ml) langsam zugetropft. Die Suspension wurde für eine Stunde bei 90 °C gerührt. Zur Aufarbeitung wurde das Reaktionsgemisch langsam auf Eis getropft, wobei ein weißer Feststoff ausfiel. Das Gemisch wurde mit Ammoniaklösung (25 %ig) neutralisiert und anschließend mit CH_2Cl_2 (3x50 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden einrotiert. Der zurückbleibende weiße Feststoff war bereits EA-rein und wurde mit quantitativer Ausbeute (1.67 g) erhalten.

DC: $R_f = 0.56$ (Hexan/EtOAc 10/1);

Schmelzpunkt: 154-165 °C;^[98]

$^1\text{H-NMR}$: (250 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): 8.48 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 8.39 (d, $J = 2$ Hz, 1H), 7.96 – 7.93 (m, 2H), 7.68 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H);

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 1581, 1552, 1485, 1443, 1382, 1330, 1286, 1186, 1136, 1096, 1055, 969, 945, 883, 869, 823, 808, 661, 631$;

Die spektroskopischen Daten waren identisch mit der Literatur.^[98]

13.2 Synthese der Tripeptide

13.2.1 Allgemeine Versuchsvorschrift für die Herstellung der Tripeptide (84) bis (108) mittels Fmoc-Festphasen-Synthese

Für die Tripeptidsynthese wurde das Rinkamid-Harz MBHA (Novabiochem, 01-64-0037, Beladung nach Herstellerangabe) eingesetzt.

Die Synthese wird exemplarisch für die Herstellung des Tripeptids *D*-Arg-*D*-Arg-*D*-Arg beschrieben. Alle weiteren natürlichen und nicht-natürlichen Tripeptide wurden analog zu dieser Vorgehensweise synthetisiert. Die eingesetzten Edukte, sowie die Kapazität des Harzes sind tabellarisch aufgeführt.

13.2.2 Synthese des Tripeptids CONH₂-*D*-Arg-*D*-Arg-*D*-ArgNH₂ (90)

Harz	Rink Amid MBHA , cap= 0.72 mmol/g	200 mg (0.144 mmol)	
AS 1/AS 2/AS 3	Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH, [648.8 g/mol]	2 eq	187 mg
Kupplungs- reagenzien	HOBt [153.10 g/mol]	2 eq	45 mg
	DIC [126.20 g/mol], $\rho = 0.815 \text{ g/ml}$	2 eq	45 μl
Lösungsmittel	DMF		1.5 ml

200 mg trockenes Rink Amid MBHA Harz wurde in einer Spritze mit Filter eingewogen. Das Harz wurde zunächst zweimal für 10 min mit 2 ml CH₂Cl₂ behandelt, anschließend wurde das Lösungsmittel auf DMF umgestellt und hierfür fünfmal für fünf Minuten mit DMF gespült. Das Fmoc-geschützte Harz wurde zunächst mit einer Lösung aus Piperidin in DMF (25 %) entschützt, wobei das Harz dreimal mit dieser Lösung versetzt wurde (15 min/5min/2min). Nach dem Abspalten wurde die feste Phase fünfmal mit DMF gewaschen. Im ersten Kupplungsschritt wurden zunächst 187 mg Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH (2 eq) in 2 ml DMF gelöst und mit 45 mg HOBt (2 eq) sowie 45 μl DIC (2 eq) versetzt und zum Harz gegeben. Nach drei Stunden wurde die feste Phase wiederum fünfmal mit DMF gewaschen und anschließend einem Kaisertest unterzogen. Bei nicht vollständiger Kupplung (positiver Kaisertest) der Fmoc-Aminosäure wurde die Kupplung für weitere 3 Stunden wiederholt. Bei erfolgreicher Kupplung wurde die erste gekuppelte

Aminosäure mit Piperidin/DMF analog der oben beschriebenen Vorgehensweise entschützt, das Harz anschließend wieder mit DMF gewaschen und die zweite Fmoc-Aminosäure auf das Harz gekuppelt. Der dritte Baustein wurde analog gekuppelt. Nach dem Entschützen der dritten Fmoc-Gruppe, wurde das Harz ausgiebig mit CH_2Cl_2 gewaschen und im Vakuum getrocknet.

13.2.3 Abspaltung des Tripeptids und der Schutzgruppen vom Harz

Das getrocknete Harz wurde für fünf Stunden mit folgender Abspalllösung behandelt: TFA (1650 μL), Thioanisol (100 μL), H_2O (100 μL), Phenol (50 mg) und EDT (50 μL)

Das Harz verfärbte sich beim Aufziehen der Lösung sehr schnell zu orange bis rot. Nach fünf Stunden wurde die Abspalllösung in eisgekühlten Ether getropft, wobei ein weißer flockiger Feststoff ausfällt. Das Harz wurde nochmals für fünf Minuten mit TFA gespült und die Lösung ebenfalls auf Ether gegeben. Die Peptidfällung wurde über Nacht bei -18°C vervollständigt. Das Tripeptid wurde abzentrifugiert und der überstehende Ether entnommen. Das Produkt wurde noch weitere fünfmal mit Ether behandelt (Ultraschallbad) und abzentrifugiert. Nach vollständigem Abzug des Lösungsmittels im leichten Vakuum wurde das zurückbleibende Pellet in Wasser (DEPC behandelt) gelöst und dreimal in der Speedvac aufkonzentriert, um leichtflüchtige Verunreinigungen zu beseitigen. Man erhielt 54 mg $\text{CONH}_2\text{-D-Arg-D-Arg-D-ArgNH}_2$ mit einer Ausbeute von 77 %.

Abschließend wurde das Peptid in Wasser aufgenommen und gegebenenfalls einer HPLC-Aufreinigung unterzogen.

Säule: ReprosilAQ 18 C

Eluent: wäßrige 0.1%ige Trifluoressigsäure - Acetonitril 100 : 2 (präparativ);

Retentionszeit: 3.38 min, Grad #1(analytisch)

MS (ESI) m/z (%): 486.1 (2.93 %) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 243.5 (100) $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, 162.67 (9.93) $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$

MS berechnet: 486.3.

13.2.4 Synthese des Tripeptids CONH₂-D-Arg-D-2pyridyl-D-ArgNH₂ (84)

Harz	Rink Amid MBHA, cap = 0.72 mmol/g	200 mg (0.144 mmol)	
AS 1/AS 3	Fmoc-D-Arg(Mtr)-OH, [608.7 g/mol]	2 eq	176 mg
AS 2	Fmoc-D-2pyridylsäure (70a) [416.4]	2 eq	120 mg
Kupplungs- reagenzien	HOBt [153.10 g/mol]	2 eq	45 mg
	DIC [126.20 g/mol], $\rho = 0.815$ g/ml	2 eq	45 μ l
Lösungsmittel	DMF		1.5 ml

Abspaltungszeit betrug 25 h, selbst nach 18 h war noch ein großer Anteil des Peptids geschützt.

Säule: ReprosilAQ 18 C

Eluent: wässrige 0.1%ige Trifluoressigsäure - Acetonitril 250 : 3 (präparativ);

Retentionszeit: 6.5 min, Grad #1 (analytisch)

Ausbeute: 74 %

MS (ESI) m/z (%): 506.5 (6) [M+H]⁺, 253.7 (100) [M+2H]²⁺

MS berechnet: 506.44.

13.2.5 Synthese des Tripeptids CONH₂-D-Arg-D-3pyridyl-D-ArgNH₂ (85)

Harz	Rink Amid MBHA, cap = 0.55 mmol/g	131 mg (0.072 mmol)	
AS 1/AS 3	Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH, [648.8 g/mol]	2 eq	93 mg
AS 2	Fmoc-D-3pyridylsäure (70b), [416.4]	2 eq	60 mg
Kupplungs- reagenzien	HOBt [153.10 g/mol]	2 eq	23 mg
	DIC [126.20 g/mol], $\rho = 0.815$ g/ml	2 eq	23 μ l
Lösungsmittel	DMF		1.0 ml

Ausbeute: 92 %

MS (ESI) m/z (%): 506.5 (10) [M+H]⁺, 253.6 (100) [M+2H]²⁺

MS berechnet: 506.3.

13.2.6 Synthese des Tripeptids CONH₂-D-Arg-D-2pyrim-D-ArgNH₂ (86)

Harz	Rink Amid MBHA, cap = 0.55 mmol/g	262 mg (0.144 mmol)	
AS 1/AS 3	Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH, [648.8 g/mol]	2 eq	187 mg
AS 2	Fmoc-D-2pyrimidinyl (70c), [417.46]	2 eq	120mg
Kupplungs- reagenzien	HOBt [153.10 g/mol]	2 eq	45 mg
	DIC [126.20 g/mol], $\rho = 0.815$ g/ml	2 eq	45 μ l
Lösungsmittel	DMF		1.5 ml

Säule: ProntoSil 120-5-C18H

Eluent: wässrige 0.1%ige Trifluoressigsäure - Acetonitril 94 : 6;

Retentionszeit: 15.87 min, Grad #1

Ausbeute: 78 %

MS (ESI) m/z (%): 507.4 (100) [M+H]⁺

MS berechnet: 507.3.

13.2.7 Synthese des Tripeptids CONH₂-D-Arg-D-pyrazinyl-D-ArgNH₂ (87)

Harz	Rink Amid MBHA, cap = 0.55 mmol/g	262 mg (0.144 mmol)	
AS 1/AS 3	Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH, [648.8 g/mol]	2 eq	187 mg
AS 2	Fmoc-D-pyrazinylsäure (70e), [417.46]	2 eq	120mg
Kupplungs- reagenzien	HOBt [153.10 g/mol]	2 eq	45 mg
	DIC [126.20 g/mol], $\rho = 0.815$ g/ml	2 eq	45 μ l
Lösungsmittel	DMF		1.5 ml

Ausbeute: 91 %

MS (ESI) m/z (%): 507.3 (8) [M+H]⁺, 254.1 (100) [M+2H]²⁺

MS berechnet: 507.3.

13.2.8 Synthese des Tripeptids CONH₂-D-Arg-L-pyrazinyl-D-ArgNH₂ (88)

Harz	Rink Amid MBHA, cap = 0.55 mmol/g	262 mg (0.144 mmol)	
AS 1/AS 3	Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH, [648.8 g/mol]	2 eq	187 mg
AS 2	Fmoc-L-pyrazinylsäure (ent-70e), [417.46]	2 eq	120mg
Kupplungsreagenzien	HOBT [153.10 g/mol]	2 eq	45 mg
	DIC [126.20 g/mol], ρ = 0.815 g/ml	2 eq	45 µl
Lösungsmittel	DMF		1.5 ml

Ausbeute: 99 %

MS (ESI) m/z (%): 507.3 (8) [M+H]⁺, 254.1 (100) [M+2H]²⁺, 169.8 (0.5) [M+3H]³⁺

MS berechnet: 507.3.

13.2.9 Synthese des Tripeptids CONH₂-D-Arg-D-Arg-D-2pyrimNH₂ (89)

Harz	Rink Amid MBHA, cap = 0.78 mmol/g	50 mg (0.039 mmol)	
AS 1/AS 2	Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH, [648.8 g/mol]	2 eq	51 mg
AS 3	Fmoc-D-2pyrimidinyl (70c), [417.46]	2 eq	33 mg
Kupplungsreagenzien	HOBT [153.10 g/mol]	2 eq	12 mg
	DIC [126.20 g/mol], ρ = 0.815 g/ml	2 eq	12 µl
Lösungsmittel	DMF		1.0 ml

Ausbeute: 60 %

MS (ESI) m/z (%): 507.4 (100) [M+H]⁺

MS berechnet: 507.3.

13.2.10 Synthese des Tripeptids CONH₂-L-Arg-L-Arg-L-ArgNH₂ (91)

Harz	Rink Amid MBHA, cap = 0.72 mmol/g	200 mg (0.144 mmol)	
AS 1/AS 2/AS 3	Fmoc-L-Arg(Pmc)-OH, [662.8 g/mol]	2 eq	191 mg
Kupplungs- reagenzien	HOBt [153.10 g/mol]	2 eq	45 mg
	DIC [126.20 g/mol], $\rho = 0.815$ g/ml	2 eq	45 μ l
Lösungsmittel	DMF		1.5 ml

Ausbeute: 83 %

MS (ESI) m/z (%): 486.1 (25) [M+H]⁺, 243.5 (73.52) [M+2H]²⁺, 162.67 (100) [M+3H]³⁺

MS berechnet: 486.3.

13.2.11 Synthese des Tripeptids CONH₂-D-Arg-D-Phe-D-ArgNH₂ (92)

Harz	Rink Amid MBHA, cap = 0.72 mmol/g	200 mg (0.144 mmol)	
AS 1/AS 3	Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH, [648.8 g/mol]	2 eq	187mg
AS 2	Fmoc-D-Phe-OH [387.4]	2 eq	112 mg
Kupplungs- reagenzien	HOBt [153.10 g/mol]	2 eq	45 mg
	DIC [126.20 g/mol], $\rho = 0.815$ g/ml	2 eq	45 μ l
Lösungsmittel	DMF		1.5 ml

Ausbeute: 69 %

MS (ESI) m/z (%): 477.4 (3) [M+H]⁺, 239.0 (100) [M+2H]²⁺

MS berechnet: 477.30.

13.2.12 Synthese des Tripeptids CONH₂-L-His-L-His-L-HisNH₂ (93)

Harz	Rink Amid MBHA, cap = 0.64 mmol/g	100 mg (0.064 mmol)	
AS 1/AS 2/ AS 3	Fmoc-L-His(Trt)OH [619.7]	2 eq	80 mg
Kupplungs- reagenzien	HOBT [153.10 g/mol]	2 eq	20 mg
	DIC [126.20 g/mol], $\rho = 0.815$ g/ml	2 eq	20 μ l
Lösungsmittel	DMF		1.5 ml

Ausbeute: 77%

MS (ESI) m/z (%): 429.2 (100) [M+H]⁺, 214.6 (14) [M+2H]²⁺

MS berechnet: 429.20.

13.2.13 Synthese des Tripeptids CONH₂-D-Arg-D-Trp-D-ArgNH₂ (94)

Harz	Rink Amid MBHA, cap = 0.72 mmol/g	200 mg (0.144 mmol)	
AS 1/AS 3	Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH, [648.8 g/mol]	2 eq	187 mg
AS 2	Fmoc-D-Trp-(Boc)-OH, [526.6]	2 eq	152 mg
Kupplungs- reagenzien	HOBT [153.10 g/mol]	2 eq	45 mg
	DIC [126.20 g/mol], $\rho = 0.815$ g/ml	2 eq	45 μ l
Lösungsmittel	DMF		1.5 ml

Ausbeute: 60 %

MS (ESI) m/z (%): 516.43 (5) [M+H]⁺, 258.70 (100) [M+2H]²⁺

MS berechnet: 516.40.

13.2.14 Synthese des Tripeptids CONH₂-D-Arg-D-Tyr-D-ArgNH₂ (95)

Harz	Rink Amid MBHA, cap = 0.55 mmol/g	262 mg (0.144 mmol)	
AS 1/AS 3	Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH, [648.8 g/mol]	2 eq	187 mg
AS 2	Fmoc-D-Tyr(tBu)-OH, [459.5]	2 eq	133 mg
Kupplungs- reagenzien	HOBT [153.10 g/mol]	2 eq	45 mg
	DIC [126.20 g/mol], $\rho = 0.815$ g/ml	2 eq	45 μ l
Lösungsmittel	DMF		1.5 ml

Ausbeute: 86 %

MS (ESI) m/z (%): 493.4 (10) [M+H]⁺, 247.1 (100) [M+2H]²⁺

MS berechnet: 493.11.

13.2.15 Synthese des Tripeptids CONH₂-D-Arg-D-Arg-D-TrpNH₂ (96)

Harz	Rink Amid MBHA, cap = 0.78 mmol/g	100 mg (0.078 mmol)	
AS 1/AS 2	Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH, [648.8 g/mol]	2 eq	102 mg
AS 3	Fmoc-D-Trp-(Boc)-OH, [526.6]	2 eq	82 mg
Kupplungs- reagenzien	HOBT [153.10 g/mol]	2 eq	24 mg
	DIC [126.20 g/mol], $\rho = 0.815$ g/ml	2 eq	24 μ l
Lösungsmittel	DMF		1.0 ml

Ausbeute: 92 %

MS (ESI) m/z (%): 516.20 (21) [M+H]⁺, 258.71 (100) [M+2H]²⁺

MS berechnet: 516.30.

13.3 Synthese der durch Inkubationen identifizierten Tripeptide

Die nachfolgenden Tripeptide wurden analog zur oben beschriebenen Variante hergestellt. Der N-Terminus wurde jedoch abschließend acetyliert. Hierzu wurde das Harz nach Kupplung der letzten Aminosäure und Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe ausgiebig mit CH_2Cl_2 gewaschen. Anschließend wurde das Harz für vier Stunden mit einer Lösung (2 ml) aus CH_2Cl_2 : Ac_2O = 80 : 20 + 10 mg DMAP/100 ml behandelt. Die vollständige Acetylierung wurde mittels des Kaisertests überprüft und die Acetylierung gegebenenfalls wiederholt. Das Harz wurde ausgiebig mit CH_2Cl_2 gewaschen und abschließend im Vakuum getrocknet. Zur Abspaltung vom Harz und der Schutzgruppen wurde das Harz für 5 Stunden mit der Abspaltlösung (1.55 ml TFA, 0.1 ml TIS, 0.05 ml EDT, 0.1 ml Thioanisol, 0.1 ml Wasser, 0.1 mg Phenol) behandelt. Die weitere Aufreinigung erfolgte analog zur oben beschriebenen Methode.

13.3.1 Synthese des Tripeptids $\text{CONH}_2\text{-D-2pyridyl-D-3pyridyl-D-ArgNHAc}$ (97)

Harz	Rink Amid MBHA, cap = 0.64 mmol/g	50 mg (0.032 mmol)	
AS 1	Fmoc-D-2pyridylsäure (70a), [416.4]	1.5 eq	20 mg
AS 2	Fmoc-D-3pyridylsäure (70b), [416.4]	1.5 eq	20 mg
AS 3	Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH, [648.8 g/mol]	2 eq	43 mg
Kupplungsreagenzien	HOBT [153.10 g/mol]	2 eq	10 mg
	DIC [126.20 g/mol], $\rho = 0.815 \text{ g/ml}$	2 eq	10 μl
Lösungsmittel	DMF		1.5 ml

Säule: ReprosilAQ 18 C

Eluent: wäßrige 0.1%ige Trifluoressigsäure - Acetonitril 93 : 7 (präparativ);

Retentionszeit: 13.00 min, Grad #1 (analytisch)

Ausbeute: 78 %;

MS (ESI) m/z (%): 568.4 (34) $[\text{M}+1\text{H}]^+$, 284.7 (100) $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$

MS berechnet: 568.68.

13.3.2 Synthese des Tripeptids CONH₂-L-Phe-L-Arg-L-Phe NHAc (98)

Harz	Rink Amid MBHA, cap = 0.64 mmol/g	100 mg (0.064 mmol)	
AS 1/ AS 3	Fmoc-L-PheOH, [387.4]	2 eq	50 mg
AS 2	Fmoc-L-Arg(Pbf)OH, [648.8]	2 eq	83 mg
Kupplungs- reagenzien	HOBt [153.10 g/mol]	2 eq	20 mg
	DIC [126.20 g/mol], $\rho = 0.815$ g/ml	2 eq	20 μ l
Lösungsmittel	DMF		1.5 ml

Ausbeute: 82 %

MS (ESI) m/z (%): 510.4 (87) [M+H]⁺, 260.2 (100) [M+2H]²⁺

MS berechnet: 510.60.

13.3.3 Synthese des Tripeptids CONH₂-L-Asn-D-2pyrim-D-2pyridylNHAc (99)

Harz	Rink Amid MBHA, cap = 0.64 mmol/g	50 mg (0.032 mmol)	
AS 1	Fmoc-L-Asn(Trt)OH, [596.7]	2eq	38 mg
AS 2	Fmoc-D-2pyrimidinylsäure (70c), [417.4]	1.5 eq	20 mg
AS 3	Fmoc-D-2pyridylsäure (70a), [416.4]	1.5 eq	20 mg
Kupplungs- reagenzien	HOBt [153.10 g/mol]	2 eq	10 mg
	DIC [126.20 g/mol], $\rho = 0.815$ g/ml	2 eq	10 μ l
Lösungsmittel	DMF		1.5 ml

Säule: ReprosilAQ 18 C

Eluent: wäßrige 0.1%ige Trifluoressigsäure - Acetonitril 93 : 7 (präparativ);

Retentionszeit: 13.44 min, Grad #1 (analytisch);

Ausbeute: 69 %;

MS (ESI) m/z (%): 527.3 (100) [M+H]⁺, 264.1 (26) [M+2H]²⁺

MS berechnet: 527.6.

13.3.4 Synthese des Tripeptids CONH₂- L-Phe-L-His-L-ArgNHAc (100)

Harz	Rink Amid MBHA, cap = 0.64 mmol/g	100 mg (0.064 mmol)	
AS 1	Fmoc-L-PheOH [387.4]	2 eq	50 mg
AS 2	Fmoc-L-His(Trt)OH [619.7]	2 eq	80 mg
AS 3	Fmoc-L-Arg(Pbf) [648.8]	2 eq	83 mg
Kupplungs- reagenzien	HOBT [153.10 g/mol]	2 eq	20 mg
	DIC [126.20 g/mol], $\rho = 0.815$ g/ml	2 eq	20 μ l
Lösungsmittel	DMF		1.5 ml

Ausbeute: 79 %

MS (ESI) m/z (%): 500.4 (100) [M+H]⁺, 250.9 (6) [M+2H]²⁺

MS berechnet: 500.56.

13.3.5 Synthese des Tripeptids CONH₂-L-Phe-D-Arg-L-LysNHAc (101)

Harz	Rink Amid MBHA, cap = 0.64 mmol/g	100 mg (0.064 mmol)	
AS 1	Fmoc-L-PheOH, [387.4]	2 eq	50 mg
AS 2	Fmoc-D-Arg(Pmc)OH, [662.8]	2 eq	85 mg
AS 3	Fmoc-L-Lys(Boc)OH, [468.6]	2 eq	60 mg
Kupplungs- reagenzien	HOBT [153.10 g/mol]	2 eq	20 mg
	DIC [126.20 g/mol], $\rho = 0.815$ g/ml	2 eq	20 μ l
Lösungsmittel	DMF		1.5 ml

Ausbeute: 84 %

MS (ESI) m/z (%): 491.4 (23) [M+H]⁺, 246.1 (100) [M+2H]²⁺

MS berechnet: 491.59.

13.3.6 Synthese des Tripeptids CONH₂-L-His-L-His-L-HisNHAc (102)

Harz	Rink Amid MBHA, cap = 0.64 mmol/g	100 mg (0.064 mmol)	
AS 1/AS 2/ AS 3	Fmoc-L-His(Trt)OH, [619.7]	2 eq	80 mg
Kupplungs- reagenzien	HOBt [153.10 g/mol]	2 eq	20 mg
	DIC [126.20 g/mol], ρ = 0.815 g/ml	2 eq	20 µl
Lösungsmittel	DMF		1.5 ml

Ausbeute: 87 %

MS (ESI) m/z (%): 471.30 (18) [M+H]⁺, 236.14 (100) [M+2H]²⁺, 157.09 (0.2) [M+3H]²⁺

MS berechnet: 471.48

13.3.7 Synthese des Tripeptids CONH₂-D-Lys-D-Arg-D-ArgNHAc (103)

Harz	Rink Amid MBHA, cap = 0.64 mmol/g	100 mg (0.064 mmol)	
AS 1	Fmoc-D-Lys(Boc)OH [468.6]	2 eq	60 mg
AS 2/AS 3	Fmoc-D-Arg(Pmc)OH, [662.8]	2 eq	85 mg
Kupplungs- reagenzien	HOBt [153.10 g/mol]	2 eq	20 mg
	DIC [126.20 g/mol], ρ = 0.815 g/ml	2 eq	20 µl
Lösungsmittel	DMF		1.5 ml

Säule: ReprosilAQ 18 C

Eluent: wäßrige 0.1%ige Trifluoressigsäure - Acetonitril 96.5 : 3.5 (präparativ);

Retentionszeit: 5.13 min, Grad #1 (analytisch);

Ausbeute: 92 %;

MS (ESI) m/z (%): 500.4 (6) [M+H]⁺, 250.7 (100) [M+2H]²⁺

MS berechnet: 500.61.

13.3.8 Synthese des Tripeptids CONH₂-D-2pyridyl-D-2pyridyl-D-2pyrimNHAc (104)

Harz	Rink Amid MBHA, cap = 0.64 mmol/g	50 mg (0.032 mmol)	
AS 1	Fmoc-D-2pyridylsäure (70a), [416.4]	1.5 eq	20 mg
AS 2	Fmoc-D-2pyridylsäure (70a), [416.4]	1.5 eq	20 mg
AS 3	Fmoc-D-2pyrimidinylsäure (70c), [417.4]	1.5 eq	20 mg
Kupplungsreagenzien	HOBt [153.10 g/mol]	2 eq	10 mg
	DIC [126.20 g/mol], ρ = 0.815 g/ml	2 eq	10 µl
Lösungsmittel	DMF		1.5 ml

Säule: ReprosilAQ 18 C

Eluent: wäßrige 0.1%ige Trifluoressigsäure - Acetonitril 90 : 10 (präparativ);

Retentionszeit: 14.52 min, Grad#1 (analytisch);

Ausbeute: 81 %

MS (ESI) m/z (%): 589.4 (27) [M+H]⁺, 295.2 (100) [M+2H]²⁺

MS berechnet: 589.70.

13.3.9 Synthese des Tripeptids CONH₂-L-Phe-D-2pyrim-D-2pyridylNHAc (105)

Harz	Rink Amid MBHA, cap = 0.64 mmol/g	50 mg (0.032 mmol)	
AS 1	Fmoc-L-PheOH [387.4]	2 eq	25 mg
AS 2	Fmoc-D-2pyrimidinylsäure (70c), [417.4]	1.5 eq	20 mg
AS 3	Fmoc-D-2pyridylsäure (70a), [416.4]	1.5 eq	20 mg
Kupplungsreagenzien	HOBt [153.10 g/mol]	2 eq	10 mg
	DIC [126.20 g/mol], ρ = 0.815 g/ml	2 eq	10 µl
Lösungsmittel	DMF		1.5 ml

Säule: ReprosilAQ 18 C

Eluent: wäßrige 0.1%ige Trifluoressigsäure - Acetonitril 83 : 17 (präparativ);

Retentionszeit: 16.34 min, Grad#1 (analytisch);

Ausbeute: 84 %

MS (ESI) m/z (%): 560.4 (100) $[M+H]^+$, 280.7 (22) $[M+2H]^{2+}$

MS berechnet: 560.66.

13.3.10 Synthese des Tripeptids CONH₂-L-Leu-D-Arg-D-ArgNHAc (106)

Harz	Rink Amid MBHA, cap = 0.64 mmol/g	100 mg (0.064 mmol)	
AS 1	Fmoc-L-LeuOH [353.4]	2 eq	46 mg
AS2/AS 3	Fmoc-D-Arg(Pmc)OH [662.8]	2 eq	85 mg
Kupplungs- reagenzien	HOBT [153.10 g/mol]	2 eq	20 mg
	DIC [126.20 g/mol], $\rho = 0.815$ g/ml	2 eq	20 μ l
Lösungsmittel	DMF		1.5 ml

Ausbeute: 73 %

MS (ESI) m/z (%): 485.4 (11) $[M+H]^+$, 243.2 (100) $[M+2H]^{2+}$

MS berechnet: 485.32.

13.3.11 Synthese des Tripeptids CONH₂-L-Arg-D-Arg-L-PheNHAc (107)

Harz	Rink Amid MBHA , cap= 0.64 mmol/g	100 mg (0.064 mmol)	
AS 1	Fmoc-L-Arg(Pbf) [648.8]	2 eq	83 mg
AS 2	Fmoc-D-Arg(Pmc) [662.8]	2 eq	85 mg
AS 3	Fmoc-L-PheOH [387.4]	2 eq	50 mg
Kupplungs- reagenzien	HOBT [153.10 g/mol]	2 eq	20 mg
	DIC [126.20 g/mol], $\rho = 0.815$ g/ml	2 eq	20 μ l
Lösungsmittel	DMF		1.5 ml

Säule: ReprosilAQ 18 C

Eluent: wäßrige 0.1%ige Trifluoressigsäure - Acetonitril 85 : 15 (präparativ);

Retentionszeit: 14.94 min, Grad #1 (analytisch);

Ausbeute: 79 %;

MS (ESI) m/z (%): 519.3 (31) $[M+H]^+$, 260.09 (100) $[M+2H]^{2+}$

MS berechnet: 519.61.

13.3.12 Synthese des Tripeptids CONH₂-D-Lys-D-Arg-L-PheNHAc (108)

Harz	Rink Amid MBHA, cap = 0.64 mmol/g	100 mg (0.064 mmol)	
AS 1	Fmoc-D-Lys(Boc)OH, [468.6]	2 eq	60 mg
AS 2	Fmoc-D-Arg(Pmc)OH, [662.8]	2 eq	85 mg
AS 3	Fmoc-L-PheOH, [387.4]	2 eq	50 mg
Kupplungs- reagenzien	HOBT [153.10 g/mol]	2 eq	20 mg
	DIC [126.20 g/mol], $\rho = 0.815$ g/ml	2 eq	20 μ l
Lösungsmittel	DMF		1.5 ml

Säule: ReprosilAQ 18 C

Eluent: wäßrige 0.1%ige Trifluoressigsäure - Acetonitril 85 : 15 (präparativ);

Retentionszeit: 14.72 min, Grad #1 (analytisch);

Ausbeute: 81 %;

MS (ESI) m/z (%): 491.29 (38) $[M+H]^+$, 246.16 (100) $[M+2H]^{2+}$

MS berechnet: 491.60.

14 Stöchiometrie von Tat-RNA-Komplexen

14.1 Herstellung von HIV-1 TAR_{wt}

Zur *in vitro* Transkription von HIV-1 TAR_{wt}-RNA wurden 30 µl DEPC Wasser, 30 µl rNTPmix (25 mM/NTP), 20 µl T7 Transkriptionspuffer 5x und 10 µl T7/TAR_{wt}-Templat-DNA in ein DEPC behandeltes Eppendorfcap pipettiert, gevortext und anschließend abzentrifugiert. Nach Zugabe von 10 µl T7 Polymerase Enzym Mix wurde für 4 h bei 37 °C inkubiert. Zur Entfernung des DNA-Templates wurde das Gemisch zunächst für 5 min bei 90 °C erhitzt, anschließend auf Eis abgekühlt, mit 10 µl DNase Puffer x10 und 20 µl DNase (1U/µl) versetzt und nochmals für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Abtrennung der Enzyme wurde mittels Phenol-Extraktion durchgeführt. Hierzu wurde mit 130 µl einer Lösung von Phenol:Chloroform: Isoamylalkohol (25:24:1, Puffer gesättigte Lösung, 10 mM TrisHCl, pH 8) extrahiert, der Überstand entnommen und das Reaktionsgemisch erneut mit 50 µl DEPC Wasser extrahiert. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden anschließend mit 170 µl Chloroform:Isoamylalkohol (24:1, Puffer gesättigte Lösung, 10 mM TrisHCl, pH 8) extrahiert. Der wässrige Überstand wurde entnommen und mit 17 µl (1/10 Volumen) Acetat-Puffer (3M NaAc, pH 5.2 mit HAc) und 510 µl (3 Volumen) absolutem Ethanol versetzt. Der weiß anfallende Niederschlag wurde im Eisfach (-25 °C) komplettiert. Die RNA wurde anschließend 30 min abzentrifugiert und das Pellet nach Entfernen des Überstandes nochmals mit Ethanol gewaschen. Nach Entnahme des Überstands wurde die TAR-RNA in 1 ml DEPC Wasser gelöst und mittels einer NAPTM10 Säule (Pharmacia Biotech, Sephadex G-25 M) entsalzt und gleichzeitig überschüssige NTPs abgetrennt. Die TAR_{wt}-RNA wurde in der Speedvac getrocknet, in insgesamt 100 µl DEPC Wasser aufgenommen und der Gehalt an RNA abschließend UV-spektrometrisch bestimmt (260 nm) (vgl. Tab. 14.1).

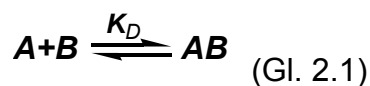
Tab. 14.1: Ausbeuten der TAR_{wt}-Transkription

RNA	Verd.	Absorb.	Berechnung	Gehalt
TAR _{wt}	500	0.2667	[Abs.] x [emp.Faktor=40] x	5.3 µg/µl
TAR _{wt}	500	0.2546	[Verdünnung] / 1000	5.1 µg/µl

Die so hergestellte TAR-RNA wurde anschließend für die FRET-Messungen verwendet. Für die Bestimmung der Stöchiometrie des Tat-TAR-Komplexes wurde die Probe gelelektrophoretisch aufgereinigt.

14.2 Bestimmung von Bindungskonstanten

Um die Stöchiometrie des Tat-TAR-Komplexes zu bestimmen, wurde mittels *in vitro* Fluoreszenz-Assay eine Titration des Tat-Peptids mit der TAR_{wt}-RNA (HIV-1) durchgeführt. Anhand der Titrationskurve sollte nach Gleichung (Gl. 2.4) die Bindungskonstante des Tat-Peptids ermittelt werden. Gleichzeitig sollte überprüft werden, ob unter den gewählten Assay-Bedingungen eine 1:1 Stöchiometrie des Tat-TAR-Komplexes vorliegt. Die Bindungskonstante (K_D) läßt sich aus der Gleichung (Gl. 2.4) berechnen:



Die Gleichgewichtskonstante ergibt sich aus:

$$K_D = \frac{AB}{A \cdot B} \quad (\text{Gl. 2.2}) \quad \text{mit} \quad \begin{aligned} A &= A_0 - AB \\ B &= B_0 - AB \end{aligned}$$

Zur Berechnung dient zunächst folgende Annahme: A_0 , B_0 und K_D seien bekannt. Die Konzentrationen A bzw. B sind durch die Differenz der Ausgangskonzentration und der Komplexkonzentration definiert. Durch Einsetzen in oben stehende Gleichung erhält man:

$$K_D = \frac{AB}{(A_0 - AB)(B_0 - AB)} \quad (\text{Gl. 2.3})$$

Lösen der Gleichung nach AB ergibt:

$$AB = \frac{1}{2}(A_0 + B_0 + K_D) - \sqrt{\frac{1}{4}(A_0 + B_0 + K_D)^2 - A_0 \cdot B_0} \quad (\text{Gl. 2.4})$$

Das Einsetzen der bekannten Werte für alle Konzentrationen der Titration ergibt, unter Berücksichtigung des kleinsten Fehlers über alle Werte AB, die Bindungskonstante K_D . Diese wird hierbei so angepaßt, daß der kleinste Fehler erhalten wird.

14.3 Allgemeine Vorschrift zur Titration des Tat-Peptids mit RNA am Beispiel der HIV-1 TAR_{wt}-RNA

Für die Titration wurde PAGE gereinigte RNA verwendet. Die Konzentration wurde UV-metrisch bestimmt (siehe 14.1). Die Titration wurde wie folgt durchgeführt: Zu einer konstanten Konzentration des Tat-Peptids (100 nM) wurde die TAR_{wt}-RNA in aufsteigenden Konzentrationen bis zum Sättigungsbereich (5 nM bis 1 µM) titriert, der in diesem Fall eine 1:1 Stöchiometrie repräsentierte. Hierzu wurden Lösungen mit folgenden Konzentrationen hergestellt:

TAR-Lösung I*: 1 µM

TK-Puffer*: 500 mM Tris-HCl, pH 7.4, 200 mM KCl, 0.1% Triton X-100

Tat-Peptid*: 1 µM

DEPC-Wasser: variabel

*Es ist zu beachten, daß die Konzentration auf der Mikrotiterplatte um den Faktor 10 verdünnt wird.

Bedingungen:

Gerät: Fluostar (BMG Labtechnologies)

Mikrotiterplatte: Corning 3650, non-binding surface, black

Verstärkungsfaktor (Gain): ca. 90%

Absorption: 544 nm; Emission: 590 nm

Temperatur: 37 °C

Schütteln der Mikrotiterplatte: orbital vor jeder Messung

Meßwert: Mittelwertbildung aus 5 Messungen, Aufnahme des Messwerts ca. 5 Minuten nach Zugabe aller Komponenten (annähernde Meßwertkonstanz der 5 Einzelmessungen)

Auf einer Mikrotiterplatte wurde jeweils 10 µl Tat-Peptid (entspricht einer Peptidkonzentration von 100 nM im Well) mit einer aufsteigenden Konzentration (10 nM bis 500 nM) an TAR_{wt} HIV-1 RNA bei einer konstanten Temperatur von 37°C titriert. Das Titrationsprofil ist in Tab. 14.2 abgebildet. Das Endvolumen für jedes Well betrug exakt 100 µl. Die Zugabe der einzelnen Komponenten entsprach der

Reihenfolge wie in der Tabelle (Tab. 14.2) dargestellt. Als Puffer wurden jeweils 10 µl TK-Puffer verwendet, das verbleibende Volumen wurde mit DEPC-Wasser entsprechend auf 100 µl Volumen ergänzt (siehe Tab. 14.2). Die erhaltene relative Fluoreszenzeinheit (rel. Fluorescence unit, RFU) wurde über den Faktor Q_{Tat} normiert und ergibt sich durch folgende Gleichung Gl. 2.5:

$$Q_{\text{Tat}} = \frac{RFU(\text{Tat}_{\text{gebunden}})}{RFU(\text{Tat}_{\text{frei}})} \quad (\text{Gl. 2.5})$$

mit $RFU(\text{Tat}_{\text{gebunden}}) = \text{RFU A2 bis B7}$ (vgl. Tab. 14.2)

und $RFU(\text{Tat}_{\text{frei}}) = \text{RFU A1}$ (vgl. Tab. 14.2)

Die zugehörige Grafik ist in Abb. 14.1 dargestellt. Aus der Berechnung (Gl. 2.5) ergibt sich bei Zugrundelegung eines 1:1 Komplexierungs-Modells ein K_D von 2 nM bei einer Sättigung im Bereich von 145 nM (korrigierter Wert).

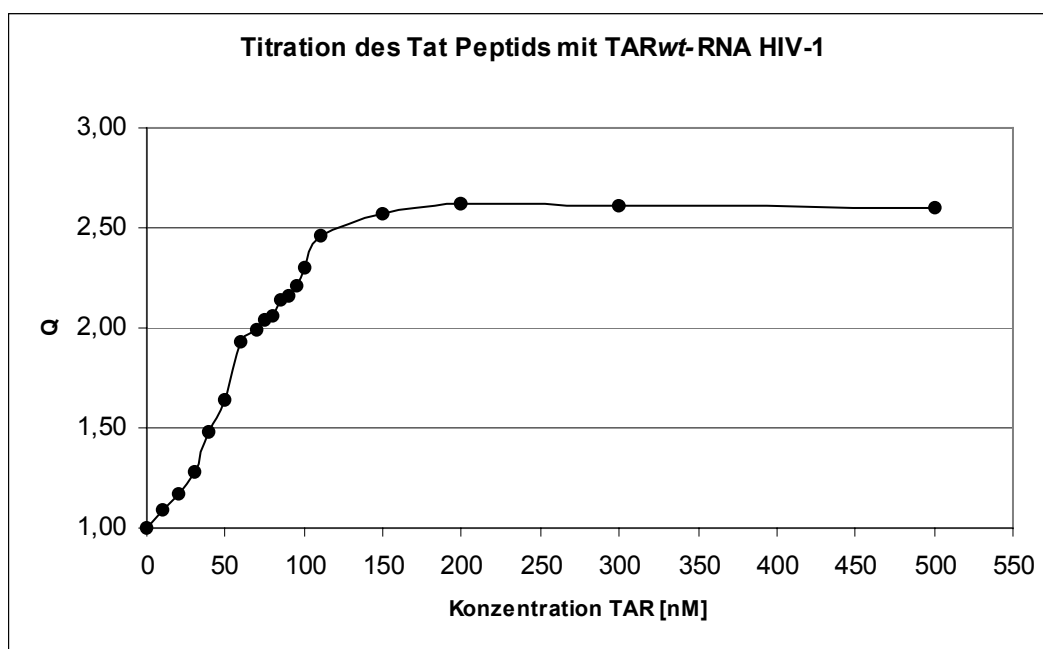


Abb. 14.1: Titration des Tat-Peptids mit TARwt-RNA HIV-1

Tab. 14.2: Titrationsprofil der Titration des Tat-Peptids mit der TARwt-RNA

	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
H ₂ O [μl]	80	30	50	60	65	69	70	70,5
TK-P. [μl]	10	10	10	10	10	10	10	10
Tat [μl]	10	10	10	10	10	10	10	10
TAR [μl]	0	50 (I)	30 (I)	20 (I)	15 (I)	11 (I)	10 (I)	9,5 (I)
Konz. [nM]	0	500	300	200	150	110	100	95
RFU	21948	57015	57321	57478	56359	54062	50389	48448
Q _{Tat}		2,60	2,61	2,62	2,57	2,46	2,30	2,21

	A9	A10	A11	A12	B1	B2	B3	B4
H ₂ O [μl]	71	71,5	72	72,5	73	74	75	76
TK-P. [μl]	10	10	10	10	10	10	10	10
Tat [μl]	10	10	10	10	10	10	10	10
TAR [μl]	9 (I)	8,5 (I)	8 (I)	7,5 (I)	7 (I)	6 (I)	5 (I)	4 (I)
Konz. [nM]	90	85	80	75	70	60	50	40
RFU	47474	46923	45125	44705	43617	42408	36068	32463
Q _{Tat}	2,16	2,14	2,06	2,04	1,99	1,93	1,64	1,48

	B5	B6	B7
H ₂ O [μl]	77	78	79
TK-P. [μl]	10	10	10
Tat [μl]	10	10	10
TAR [μl]	3 (I)	2 (I)	1 (I)
Konz. [nM]	30	20	10
RFU	28066	25709	23962
Q _{Tat}	1,28	1,17	1,09

14.4 Titration des Tat-Peptids mit tRNA

Die Titration des Tat-Peptids mit der tRNA wurde analog zur oben beschriebenen Methode durchgeführt.

tRNA Lösung I: 10 μM

tRNA Lösung II: 1 μM

Die Graphik der Titration ist in Abb.14.2, das entsprechende Titrationsprofil ist in der Tabelle (Tab. 14.3) dargestellt.

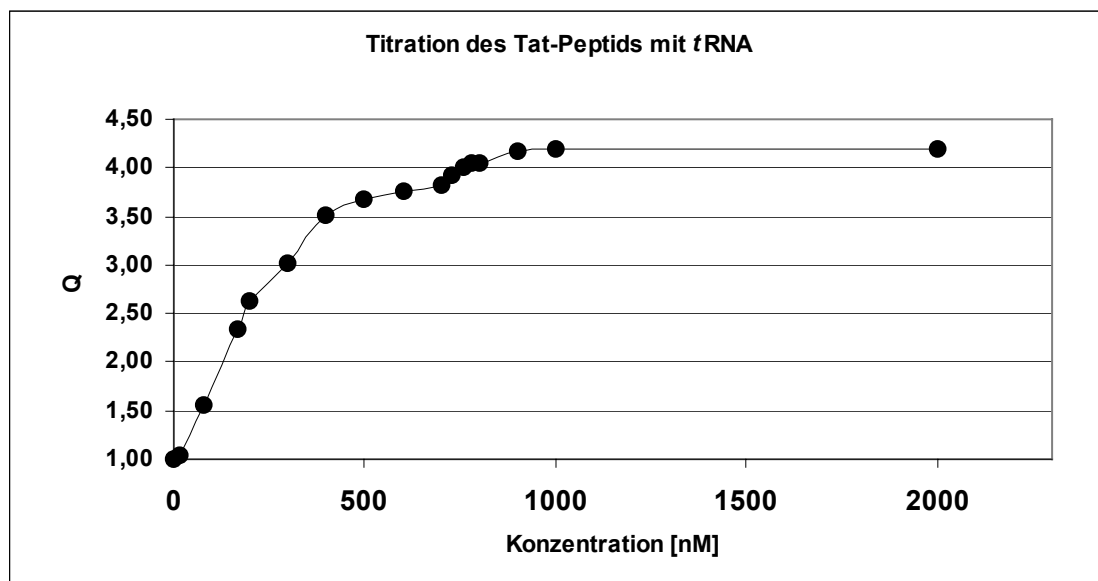


Abb. 14.2: Titration des Tat-Peptids (100 nM) mit tRNA

Die Bindungskonstante wurde mit der Gleichung (Gl. 2.4) unter der willkürlichen Annahme eines 1:1-Komplexes berechnet und ergab 104 nM, bei einer Sättigung im Bereich von 900 nM.

Tab. 14.3: Titrationsprofil der Titration des Tat-Peptids mit der tRNA

	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9
H ₂ O [μl]	80	60	70	71	72	72,2	72,4	72,7	73
TK-P. [μl]	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Tat [μl]	10	10	10	10	10	10	10	10	10
tRNA [μl]	0	20 (I)	10 (I)	9 (I)	8 (I)	7,8 (I)	7,6 (I)	7,3 (I)	7 (I)
Konz. [nM]	0	2000	1000	900	800	780	760	730	700
RFU	12717	53179	53369	52910	51477	51380	50978	49829	48677
Q _{Tat}		4,18	4,20	4,16	4,05	4,04	4,01	3,92	3,83

	A10	A11	A12	B1	B2	B3	B4	B5
H ₂ O [μl]	74	75	76	50	60	63	72	78,4
TK-P. [μl]	10	10	10	10	10	10	10	10
Tat [μl]	10	10	10	10	10	10	10	10
tRNA [μl]	6 (I)	5 (I)	4 (I)	30 (II)	20 (II)	17 (II)	8 (II)	1,6 (II)
Konz. [nM]	600	500	400	300	200	170	80	16
RFU	47712	46789	44635	38445	33471	29683	19662	13223
Q _{Tat}	3,75	3,68	3,51	3,02	2,63	2,33	1,54	1,04

14.5 Titration des Tat-Peptids mit der TAR*bulgeless*-RNA (HIV-1)

Die Titration des Tat-Peptids mit der TAR*bulgeless*-RNA wurde analog zur oben beschriebenen Methode durchgeführt.

TAR*bulgeless* Lösung I: 60 μM

TAR*bulgeless* Lösung II: 10 μM

TAR*bulgeless* Lösung III: 1 μM

Die Graphik der Titration ist in Abb. 14.3, das entsprechende Titrationsprofil ist in der Tabelle (Tab. 14.4) dargestellt.

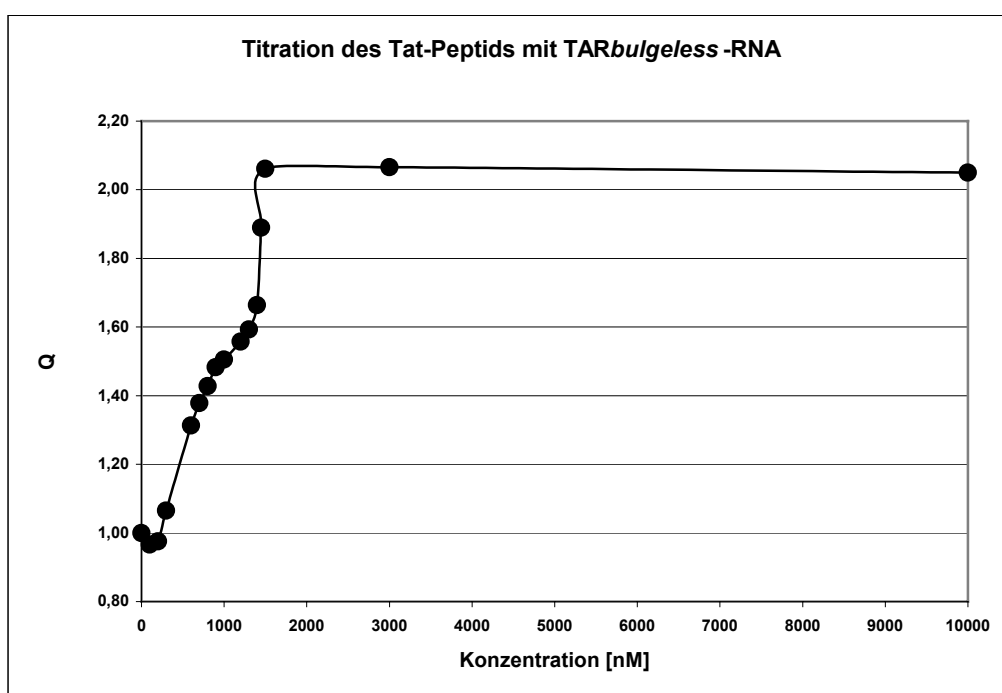


Abb. 14.3: Titration des Tat-Peptids mit TAR*bulgeless*

Aufgrund des Kurvenverlaufs konnte die Bindungskonstante des Tat-Peptids zur TAR*bulgeless* nicht berechnet werden. Sie ist aber beim Vergleich mit der TAR*wt*-RNA um mehr als den Faktor 10 größer einzuordnen.

Tab. 14.4: Titrationsprofil der Titration des Tat-Peptids mit der TARbulgeless

	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
H ₂ O [μl]	80	63,4	75	65	65,5	66	67	68
TK-P. [μl]	10	10	10	10	10	10	10	10
Tat [μl]	10	10	10	10	10	10	10	10
TARb/ [μl]	-	16,6 (I)	5 (I)	15 (II)	14,5 (II)	14 (II)	13 (II)	12 (II)
Konz. [nM]	-	10000	3000	1500	1450	1400	1300	1200
RFU	26015	53317	53739	53622	49165	43290	41448	40506
Q _{Tat}		2,05	2,07	2,06	1,89	1,66	1,59	1,56

	A9	A10	A11	A12	B1	B2	B3	B4
H ₂ O [μl]	70	71	72	73	74	77	60	70
TK-P. [μl]	10	10	10	10	10	10	10	10
Tat [μl]	10	10	10	10	10	10	10	10
TARb/ [μl]	10 (II)	9 (II)	8 (II)	7 (II)	6 (II)	3 (II)	20 (III)	10 (III)
Konz. [nM]	1000	900	800	700	600	300	200	100
RFU	39155	38581	37133	35865	34146	27714	25382	25124
Q _{Tat}	1,51	1,48	1,43	1,38	1,31	1,07	0,98	0,97

14.6 Titration des Tat-Peptids mit der TAR-RNA (HIV-2)

Die Titration des Tat-Peptids (100 nM) mit der TAR-RNA (HIV-2) erfolgte analog zur oben beschriebenen Durchführung.

HIV-2 TAR-Lösung I: 10 μM

HIV-2 TAR-Lösung II: 1 μM

Die Graphik der Titration ist in Abb.14.4, das entsprechende Titrationsprofil ist in der Tabelle (Tab. 14.5) dargestellt.

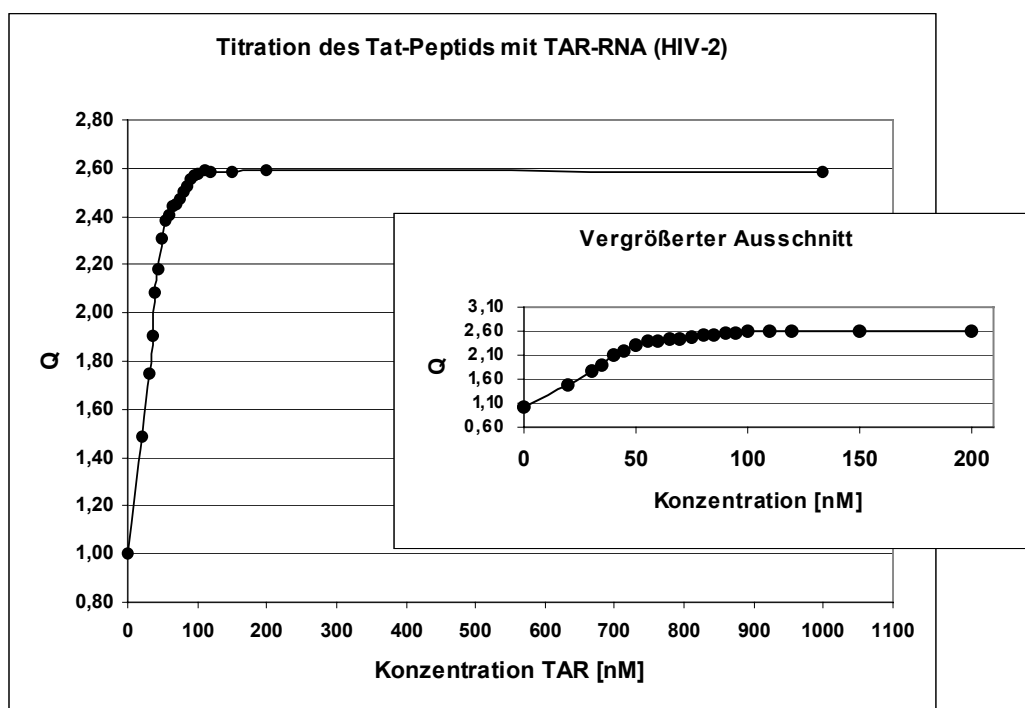


Abb. 14.4: Titration des Tat-Peptides mit TAR-RNA (HIV-2)

Nach der Kurvenanpassung durch Gleichung (Gl. 2.4) unter Annahme einer 1:1 Komplexierung wurde für das Tat-Peptid eine Bindungskonstante von 1.6 nM erhalten.

Tab. 14.5: Titrationsprofil des Tat-Peptides mit der TAR-RNA (HIV-2)

	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9
H ₂ O [μl]	80	70	60	65	68	69	70	70.5	71
TK-P. [μl]	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Tat [μl]	10	10	10	10	10	10	10	10	10
TAR [μl]	0	10 (I)	20 (II)	15 (II)	12 (II)	11 (II)	10 (II)	9.5 (II)	9 (II)
Konz. [nM]	0	1000	200	150	120	110	100	95	90
RFU	23374	60434	60634	60367	60413	60571	60299	59961	59661
Q _{Tat}	1.00	2.59	2.59	2.58	2.58	2.59	2.58	2.57	2.55

	A10	A11	A12	B1	B2	B3	B4	B5	B6
H₂O [μl]	71.5	72	72.5	73	73.5	74	74.5	75	75.5
TK-P. [μl]	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Tat [μl]	10	10	10	10	10	10	10	10	10
TAR [μl]	8.5 (II)	8 (II)	7.5 (II)	7 (II)	6.5 (II)	6 (II)	5.5 (II)	5 (II)	4.5 (II)
Konz. [nM]	85	80	75	70	65	60	55	50	45
RFU	58998	58520	57819	57310	57003	56256	55618	54010	50988
Q_{Tat}	2.52	2.50	2.47	2.45	2.44	2.41	2.38	2.31	2.18

	B7	B8	B9	B10
H₂O [μl]	76	76.5	77	78
TK-P. [μl]	10	10	10	10
Tat [μl]	10	10	10	10
TAR [μl]	4 (II)	3.5 (II)	3 (II)	2 (II)
Konz. [nM]	40	35	30	20
RFU	48675	44434	40835	34741
Q_{Tat}	2.08	1.90	1.75	1.49

14.7 Bestimmung der IC_{50} Werte für die synthetisierten Peptide

Zur Bestimmung der IC_{50} -Werte der Tripeptide (**84-108**) wurden das Tat-Peptid und die TAR $_{wt}$ -RNA (jeweils 100 nM Plattenkonzentration) in Gegenwart des TK-Puffers (10 μ l) und DEPC-Wasser vorgelegt. Zur Einstellung des FF_{max} wurden das Tat-Peptid und der Tat/TAR-RNA-Komplex mit jeweils 100 nM (Endvolumen 100 μ l, siehe Titrationsschema A1 und A2) eingemessen und auf den entsprechenden Sättigungsfaktor (bezogen auf $FF_{max} = 2.1-2.4$; entspricht einer 1:1 Stöchiometrie des Tat-TAR-Komplexes) eingestellt. Um den Titrationsbereich einzugrenzen wurde zunächst der Konzentrationsbereich des potentiellen Liganden bestimmt, in dem ein halbmaximaler Fluoreszenz-Effekt auftrat. Hierzu wurden drei verschiedene Ligandenkonzentrationen (100, 10 und 1 μ M Endkonzentration im Well) gewählt. Der IC_{50} -Wert wurde in diesem Assay durch die Ligandenkonzentration bestimmt, die bei der Messung folgende RFU bzw. normierten Wert Q aufweist:

$$RFU[IC_{50}] = \frac{RFU[(Komplex_{Tat/TAR}) + (Tat)]}{2} \quad (\text{Gl. 2.6})$$

mit $RFU (Komplex_{Tat/TAR}) = A2$ (vgl. Tab. 14.6)

$$RFU (Tat) = A1$$

$$\text{normiert: } Q[IC_{50}] = \frac{RFU[IC_{50}]}{RFU(Tat)} \quad (\text{Gl. 2. 7})$$

mit $RFU (Tat) = A1$

Im Konzentrationsbereich des IC_{50} -Wertes wurde daraufhin eine Titrationskurve aufgenommen. Hierbei wurden pro Meßzelle bei konstanter Tat-TAR-Konzentration (100 nM) absteigende Konzentrationen des potentiellen Liganden zugegeben und die zugehörige RFU nach ca. 5 Minuten (Temperaturkonstanz (37°C) und Komplexkonstanz) bestimmt. Die einzelnen Fluoreszenz-Signale (RFU) wurden ebenfalls normiert (Gl 2.5). Anhand der Titrationskurve (Abb. 14.1) konnte der zugehörige IC_{50} -Wert des TAR-Liganden ermittelt werden. Die Ermittlung des IC_{50} -Wertes ist exemplarisch für das Tripeptid $CONH_2$ -D-Arg-D-Pyrazinyl-D-ArgNH $_2$ dargestellt. Die Bestimmung der IC_{50} -Werte (TAR $_{wt}$) für alle übrigen Tripeptide wurde analog durchgeführt.

Tripeptid-Lösung I*:	1 mM
Tripeptid-Lösung II*:	100 μ M
TK-Puffer*:	500 mM Tris-HCl, pH 7.4, 200 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 10 μ l
Tat-Peptid*:	1 μ M, 10 μ l
TARwt-RNA:	1 μ M, 10 μ l
DEPC-Wasser:	Auffüllen auf 100 μ l

*Es ist zu beachten, daß die Konzentration auf der Mikrotiterplatte um den Faktor 10 verdünnt wird. Die zugehörige Graphik (Abb. 14.5) und das entsprechende Tritrationsschema ist in Tab. 14.6 dargestellt.

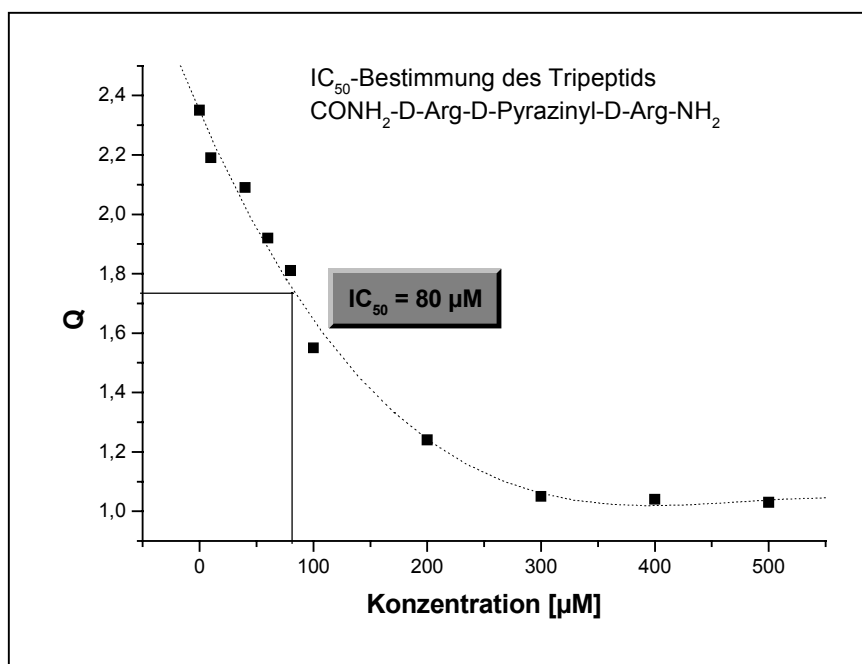


Abb. 14.5: Bestimmung eines IC₅₀-Wertes

Tab. 14.6: Titrationsprofil zur Bestimmung des IC_{50} -Wertes von $CONH_2$ -D-Arg-D-Pyrazinyl-D-ArgNH₂

	A1	A2	A3	A4	A5	A6
H ₂ O [μl]	80	70	60	30	64	62
TK-P. [μl]	10	10	10	10	10	10
Tat [μl]	10	10	10	10	10	10
TAR [μl]		10	10	10	10	10
Ligand [μl]	-	-	10 (II)	40(II)	6 (I)	8 (I)
Konz. [μM]	-	-	10	40	60	80
RFU	23790	58300	51922	53423	51051	52076
Q		2.35	2.19	2.09	1.92	1.81

	A7	A8	A9	A10	A11
H ₂ O [μl]	60	50	40	30	20
TK-P. [μl]	10	10	10	10	10
Tat [μl]	10	10	10	10	10
TAR [μl]	10	10	10	10	10
Ligand [μl]	10 (I)	20 (I)	30 (I)	40 (I)	50(I)
Konz. [μM]	100	200	300	400	500
RFU	36133	30733	24979	24741	24503
Q	1.55	1.24	1.05	1.04	1.03

Die IC₅₀-Werte der untersuchten Tripeptide sind nachfolgend in Tabelle (Tab. 14.7) aufgelistet.

Tab. 14.7: IC₅₀-Werte der untersuchten Tripeptide

Tripeptid	IC₅₀-Werte (<i>in vitro</i>) [μM]
CONH ₂ -D-Arg-D-2pyridyl-D-ArgNH ₂ (84)	80
CONH ₂ -D-Arg-D-3pyridyl-D-ArgNH ₂ (85)	20
CONH ₂ -D-Arg-D-2pyrim-D-ArgNH ₂ (86)	2
CONH ₂ -D-Arg-D-pyrazinyl-D-ArgNH ₂ (87)	80
CONH ₂ -D-Arg-L-pyrazinyl-D-ArgNH ₂ (88)	80
CONH ₂ -D-Arg-D-Arg-D-2pyrimNH ₂ (89)	110
CONH ₂ -D-Arg-D-Arg-D-ArgNH ₂ (90)	5
CONH ₂ -L-Arg-L-Arg-L-ArgNH ₂ (91)	5
CONH ₂ -D-Arg-D-Phe-D-ArgNH ₂ (92)	75
CONH ₂ -L-His-L-His-L-HisNH ₂ (93)	4200
CONH ₂ -D-Arg-D-Trp-D-ArgNH ₂ (94)	2
CONH ₂ -D-Arg-D-Tyr-D-ArgNH ₂ (95)	80
CONH ₂ -D-Arg-D-Arg-D-TrpNH ₂ (96)	90
CONH ₂ -D-2pyridyl-D-3pyridyl-D-ArgNHAc (97)	500
CONH ₂ -L-Phe-L-Arg-L-PheNHAc (98)	600
CONH ₂ -L-Asn-D-2pyrim-D-2pyridylNHAc (99)	950
CONH ₂ -L-Phe-L-His-L-ArgNHAc (100)	2000
CONH ₂ -L-Phe-D-Arg-L-LysNHAc (101)	3000
CONH ₂ -L-His-L-His-L-HisNHAc (102)	3200
CONH ₂ -D-Lys-D-Arg-D-ArgNHAc (103)	80
CONH ₂ -D-2pyridyl-D-2pyridyl-D-2pyrimNHAc (104)	150
CONH ₂ -D-Phe-D-2pyrim-D-2pyridylNHAc (105)	280
CONH ₂ -L-Leu-D-Arg-D-ArgNHAc (106)	300
CONH ₂ -L-Arg-D-Arg-L-PheNHAc (107)	300
CONH ₂ -D-Lys-D-Arg-L-PheNHAc (108)	350

14.7.1 Bestimmung der Loop-Affinität anhand des *TARbulgeless*-Assays

Die Titrations der *TARbulgeless*-RNA erfolgte analog zu der oben beschriebenen Durchführung. Es wurde hierbei mit einer Konzentration von 1500 nM (Konzentration im Well) *TARbulgeless*-RNA und mit 100 nM tat Peptid pro well gearbeitet. Die Countrates wurden bei dieser Bestimmung jedoch erst nach 10 Minuten registriert, da erst hier eine konstante Komplex-Bildung gegeben war (konstanter Wert über mehrere Messungen). Zur Beschleunigung dieses Prozesses wurde die Mikrotiterplatte innerhalb dieser Zeit im Gerät bei 37 °C belassen und mehrfach geschüttelt. Aus den Titrations erhielt man folgende IC_{50} -Werte (vgl. Tab. 14.8):

Tab. 14.8: IC_{50} -Werte aus dem *TARbl*-Assay

Verbindung	IC_{50} -Werte (<i>TARbl</i> -Assay)
CONH ₂ -L-His-L-His-L-HisNHAc (102)	500 µM
CONH ₂ -L-His-L-His-L-HisNH ₂ (93)	15 µM
CONH ₂ -D-Arg-D-Arg-D-ArgNH ₂ (90)	5 µM
Argininamid (4)	10 mM
CONH ₂ -D-Arg-D-2pyrim-D-ArgNH ₂ (86)	150 µM

15 Experimentelle Daten der kombinatorischen Bibliotheken

Zur Synthese der Tripeptid-Bibliotheken wurden folgende Reagenzien benötigt:

Kaisertest-Lösungen: Lösung I) 80 g liq. Phenol auf 20 ml Ethanol Lösung II) 5 g Ninhydrin auf 100 ml Ethanol Lösung III) 2 ml 0.001 M wäßrige KCN-Lösung auf 98 ml Pyridin;

Dimethylformamid

N-Methylpyrrolidin

Fmoc-Abspaltreagenz: Piperidin/DMF = 25 %ig

Materialien:

Filter: CELLPORE Filterplatte, Porengröße 40-100µM, XS-49040 PE, Esters Filtertechnik, Produktions-und Vertriebsgesellschaft

Harz: Amino PEGA Harz, vorgequollen in Methanol, Novabiochem, 01-64-0100, A 25151, 50-100 mesh (H₂O), Beladung nach Herstellerangaben

15.1 Herstellung der 4096er Bibliothek (II)

Zur Herstellung der Bibliothek wurde ein Amino-PEGA Harz verwendet (Novabiochem, Kapazität Harz: 0.4 mmol/g, 01-64-0100, A 25151).

Als Bausteine wurden 16 verschiedene Aminosäuren eingesetzt, die den Zugang zu einer 4096 Tripeptide umfassenden Bibliothek ermöglichten. Zum Aufbau der Bibliothek wurden folgende Aminosäuren verwendet:

Fmoc-D-Lys(Boc)OH, Fmoc-L-Lys(Boc)OH, Fmoc-D-Arg(Pmc), Fmoc-D-PheOH, Fmoc-D-LeuOH, Fmoc-D-His(Trt)OH, Fmoc-L-Asn(Trt)OH, Fmoc-D-2pyridyl (**70a**), Fmoc-D-3pyridyl (**70b**), Fmoc-D-2pyrimidinyl (**70c**), Fmoc-D-pyrazinyl (**70e**), Fmoc-L-pyrazinyl (**ent-70e**), Fmoc-L-Phenanthren (**59c**), Fmoc-L-Naphthyl (**59d**), Fmoc-L-NaphthylOMe (**59a**) sowie Fmoc-Chinolin (**59b**).

Die Festphasensynthese wurde in Spritzen durchgeführt, die zuvor mit einem Filtereinsatz versehen wurden. Nach dem Trocknen des PEGA Harzes im Vakuum über 5 h wurden pro Spritze (16 insgesamt, Volumen 2 ml) 40 mg getrocknetes

PEGA Harz (0,016 mmol) eingewogen und das Harz wie folgt auf dem Schüttler vorbehandelt:

2 x 5 min mit CH_2Cl_2

2 x 5 min DMF

1 x 15 min Abspaltreagenz Piperidin/DMF (25%ig)

1 x 10 min Abspaltreagenz Piperidin/DMF (25%ig)

5 x Spülen mit DMF

Anschließend erfolgte die Kupplung der ersten Aminosäureposition, die eingesetzten Mengen sind in der Tabelle Tab. 15.2 dargestellt. Für die Standard-Aminosäuren wurden pro Kupplungsschritt 2 eq, für die synthetischen Aminosäuren 1.5 eq eingesetzt. Die Durchführung ist exemplarisch anhand der Kupplung von D-Lys beschrieben:

15 mg Fmoc-D-Lys(Boc)OH (2eq) und 10 mg HOBT (4 eq) wurden in einem Eppendorfcap eingewogen, mit 1 ml DMF versetzt, gründlich gevortext und gegebenenfalls im Ultraschallbad in Lösung gebracht. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 μl DIC. Nach erneutem Vortexen wurde die Lösung mit der ersten Spritze aufgezogen. Das Harz wurde für 2,5 h mit der Kupplungs-Lösung behandelt, mit DMF gewaschen (fünfmal) und danach einem Kaisertest unterzogen. Bei negativem Kaisertest wurde die Kupplung des Reportermoleküls vorbereitet. Hierzu erfolgte zunächst die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mittels Piperidin/DMF analog der oben beschriebenen Vorgehensweise. Zur Kontrolle wurde an dieser Stelle ein Kaisertest (positiv!) durchgeführt. Nach gründlichem Spülen mit DMF wurde das Harz im Fall von D-Lys mit dem Tag 22 versehen (siehe Tabelle 15.2), um die erste Position zu kodieren. Hierzu wurde das PEGA Harz zunächst auf das Lösungsmittel NMP umgestellt (5 x spülen), da Anteile von Dimethylamin in Dimethylformamid zu einer unvollständigen Kupplung führen. Es wurden 0,15 mg T22 (entspricht 2 % Beladung) in einem Eppendorfcap eingewogen, mit 0,5 ml NMP versetzt und gevortext. Um eine möglichst gleichmäßige Verteilung des Tags auf dem Harz zu gewährleisten, wurde das HOBT (0,5 mg, 10 eq) separat eingewogen, mit 0,5 ml NMP und 0,5 μl DIC versetzt und gevortext. Zunächst wurde die Taglösung mit der Spritze aufgezogen, gut durchmischt und anschließend mit der HOBT/DIC-Lösung versetzt. Zur Überprüfung einer

vollständigen Tagung wurde das Harz nach 15 h ausgiebig mit DMF (fünfmal) gewaschen, gefolgt von Methanol (HPLC-rein), um Störsignale bei der folgenden GC-Messung zu vermeiden. Hierzu wurden unter dem Stereomikroskop (Zeiss Stemi 2000-C mit Filter FI S 09 1025-557 HQ 500LP) drei einzelne Harzkugeln separiert und jeweils mit einer Präpariernadel in ein GC-Probenröhrchen (Rotilabo Einsätze, 100 µl, Roth C516.1) überführt. Nach Zugabe von 10 µl MeOH (HPLC-rein) wurde das Röhrchen mit einer Kappe verschlossen und 4 h einer Bestrahlung von 366 nm ausgesetzt. Der freigesetzte Alkohol wurde anschließend am GC unter folgenden Bedingungen vermessen:

GC-Bedingungen:

Typ: HP 6890 Series Gas Chromatograph / µ-ECD mit Chemstation

Trennsäule: : HP 19091Z-433, 325 °C Max, Größe: 30 m x 250 µm x 0.25 µm

Trärgas: Helium, constant flow 1.4 ml/min, Druck: 23.34 psi

Injektor: EPC split-splitless Inlet;

Mode: splitless

Heater: 315°C

Pressure: 23.33 psi

Total flow: 70.00 ml/min

Splitless vent: 66.0 ml/min, 0.00 min

Gas saver: 20.0 ml/min, 2.00 min

Detektor: µECD Detector

Temperatur: 315 °C

Makeup Flow N₂: 58.6 ml/min

Constant col + makeup: 60.0 ml/min

Temperaturprogramm:

Setpoint: 180°C

Maximum 325 °C, Equilibration: 1.00 min

Oven ramp	°C min	Next °C	Hold (min)	Runtime
Initial		180	1.00	1.00
Ramp1	10.00	310	5.00	19.00
Ramp2	0.00			
Postrun		180	0.00	19.00

Injektionsvolumen: 5 µl

Washes	Preinjection	Postinjection
Sample	0	
Solvent A (MeOH)	2	2
Solvent B (MeOH)	2	2
Pumps	2	

Der freigesetzte Alkohol ergab folgendes Spektrum mit einer Retentionszeit bei 3.62 Minuten und konnte der Aminosäure L-Lys (T22, vgl. Tab. 15.1 und 15.2) zugeordnet werden.

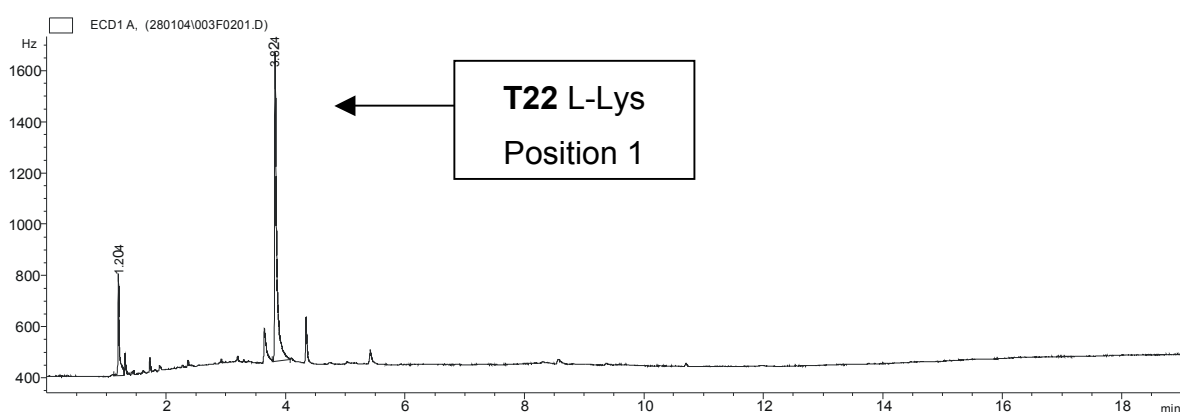


Abb. 15.1: Zuordnung der Aminosäure für Position 1

Bei nicht ausreichender Taggung (kein Signal, oder Signale unter 300Hz) der Reportermoleküle wurde unter gleichen Bedingungen noch einmal nachgekuppelt.

Nach erfolgreicher Taggung aller 16 Aminosäuren wurde das Harz miteinander vereinigt und auf dem Schüttler für 15 min in DMF durchmischt, um eine gleichmäßige Verteilung der Kugeln zu gewährleisten. Anschließend wurden gleiche Mengen der Bibliothek wiederum auf 16 verschiedene Spritzen verteilt und die zweite Position mit Aminosäuren und nachfolgend dem entsprechenden Tag gekuppelt (vgl. Tab. 15.2). Die Dekodierung der zweiten Aminosäureposition ergab z.B. exemplarisch (vgl. Abb. 15.2):

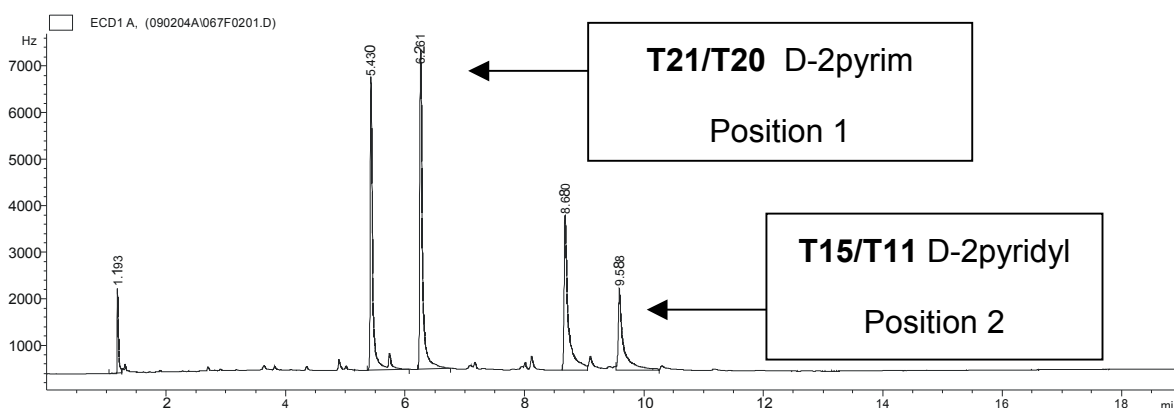


Abb. 15.2: Zuordnung der Aminosäuren für Position 1 und 2

Nach Kupplung der zweiten Aminosäure mit zugehöriger Tagkodierung wurde die Bibliothek wiederum in einer Spritze vereinigt und zur vollständigen Durchmischung mit 15 ml DMF für 15 min geschüttelt. Das Harz wurde anschließend wieder gleichmäßig auf 16 einzelne Spritzen aufgeteilt, die dritte Aminosäureposition eingeführt und mit entsprechender Kodierung belegt (vgl. Tab. 15.2). Man erhielt exemplarisch folgendes Spektrum (Abb. 15.3):

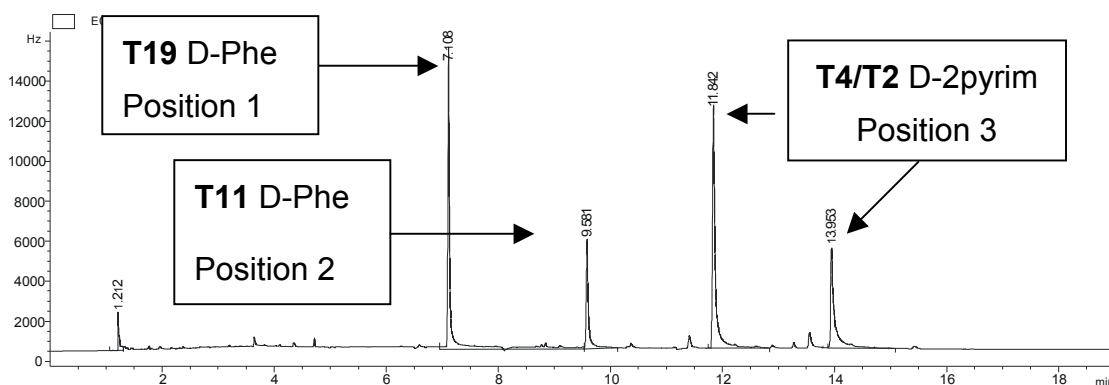


Abb. 15.3: Zuordnung der Aminosäuren für Position 1, 2 und 3

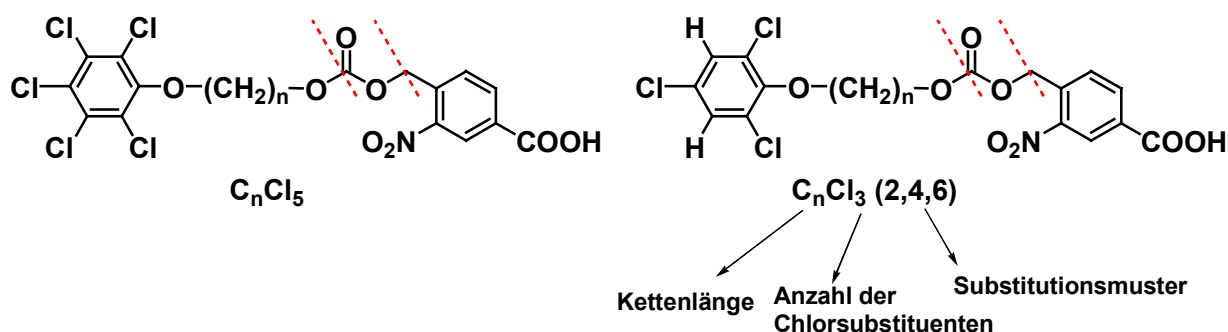
Das Bibliotheks-Harz wurde abschließend in einer 20 ml Spritze vereinigt und mit Methanol (dreimal) und CH_2Cl_2 (dreimal) gewaschen. Nach Abzug des Lösungsmittels im Vakuum wurde das Harz für 3 h lyophilisiert.

15.1.1 Acetylierung der Bibliothek

250 mg des getrockneten Bibliotheksharzes wurden in einer Spritze mit Filter eingewogen und 10 Minuten mit CH_2Cl_2 (2 ml) vorgequollen. Die Acetylierung wurde mit 2 ml Acetylierungsreagenz ($\text{Ac}_2\text{O}:\text{CH}_2\text{Cl}_2 = 20:80 + 10 \text{ mg DMAP}/100 \text{ ml}$) durchgeführt. Nach 4 h schütteln wurde ein Kaisertest durchgeführt und gegebenenfalls, nochmals mit 2 ml Acetylierungsreagenz versetzt. Nach Waschen des Harzes mit DMF (fünfmal), gefolgt von CH_2Cl_2 (dreimal), wurde die acetylierte Bibliothek 5 h getrocknet. Das getrocknete Harz wurde analog Kap. 15.1.1 behandelt.

15.1.2 Abspaltung der Schutzgruppen

250 mg des getrockneten Harzes wurden in einer Spritze mit Filter eingewogen, mit einer Lösung von 2 ml Abspaltreagenz (1.55 ml TFA, 0.1 ml TIS, 0.05 EDT, 0.1 Thioanisol, 0.1 Wasser, 0.1 Phenol) versetzt und 24 h damit behandelt. Die Lösung wurde anschließend separiert und das Harz nochmals für 30 Minuten mit 2 ml Abspaltreagenz versetzt. Nach ausgiebigen Waschen des Harzes mit CH_2Cl_2 und Methanol bis zur Geruchsneutralität, wurde abschließend nochmals mit CH_2Cl_2 gewaschen. Die Bibliothek wurde im Vakuum getrocknet und anschließend bei 4°C gelagert. Das Syntheschema der Bibliothek, sowie die Retentionszeiten der Reportermoleküle, sind auf den folgenden Seiten dargestellt (Abb. 15.4, Tab. 15.1).



C_nCl_3 o. 5 (x1,x2,x3); mit n = Kettenlänge, 3 o. 5 = Anzahl der Cl-Substituenten, (x1,x2,x3) = Substitutionsmuster vgl. Tab. 15.1

Abb. 15.4: Struktur und Substitutionsmuster des Reportermoleküls

Tab. 15.1: Retentionszeiten und Abkürzungen der Reportermoleküle

Tag $C_nCl_{3 \text{ o. } 5} (x1, x2, x3)$	Masse [g/mol]	Retentionszeit [min]	Abkürzung
$C_{12}Cl_5$	673.79	nicht eingesetzt	T1
$C_{10}Cl_5$	645.79	13.95	T2
$C_{11}Cl_5$	659.82	13.25	T3
C_9Cl_5	631.76	11.84	T4
$C_{12}Cl_3 (2,4,5)$	604.95	nicht eingesetzt	T5
$C_{12}Cl_3 (2,4,6)$	604.95	11.11	T6
$C_{11}Cl_3 (2,4,5)$	590.92	10.95	T7
$C_{11}Cl_3 (2,4,6)$	590.92	10.35	T8
C_7Cl_5	603.70	10.25	T9
$C_{10}Cl_3 (2,4,5)$	576.89	nicht eingesetzt	T10
$C_{10}Cl_3 (2,4,6)$	576.89	9.57	T11
C_6Cl_5	589.66	9.41	T12
$C_9Cl_3 (2,4,5)$	562.86	9.35	T13
$C_9Cl_3 (2,4,6)$	562.86	8.79	T14
C_5Cl_5	575.63	8.69	T15
$C_8Cl_3 (2,4,5)$	548.83	nicht eingesetzt	T16
$C_8Cl_3 (2,4,6)$	548.83	7.97	T17
$C_7Cl_3 (2,4,5)$	534.80	7.80	T18
$C_7Cl_3 (2,4,6)$	534.80	7.12	T19
$C_6Cl_3 (2,4,6)$	520.77	6.29	T20
$C_5Cl_3 (2,4,6)$	506.74	5.46	T21
$C_3Cl_3 (2,4,6)$	478.68	3.66	T22

Tab. 15.2: Syntheschema der 4096er Bibliothek (II) Teil A

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
Aminosäure M [g/mol]	D-Lys [468.5]	L-Lys [468.5]	D-Arg [662.8]	D-Phe [387.4]	D-Leu [353.4]	D-His [619.7]	L-Asn [596.7]	D-2pyridyl [416.17]
AS	15mg (2 eq) 10mg (4 eq) 10µl (4 eq)	15mg (2 eq) 10mg (4 eq) 10µl (4 eq)	21mg (2 eq) 10mg (4 eq) 10µl (4 eq)	13mg (2 eq) 10mg (4 eq) 10µl (4 eq)	12mg (2 eq) 10mg (4 eq) 10µl (4 eq)	20mg (2 eq) 10mg (4 eq) 10µl (4 eq)	19mg (2 eq) 10mg (4 eq) 10µl (4 eq)	10mg (1.5 eq) 10mg (4 eq) 10µl (4 eq)
HOBt								
DIC								
1. Kaiserstest / 2. Fmoc-Entschützung								
Tag	T22	T21	T22 / T20	T19	T18	T20	T17	T21 / T20
Tag	0.15mg	0.16mg	0.15 / 0.17mg	0.17mg	0.17mg	0.17mg	0.18mg	0.16/0.17mg
HOBt/	0.5mg	0.5mg	0.5mg	0.5mg	0.5mg	0.5mg	0.5mg	0.5mg
DIC (10 eq)	0.5µl	0.5µl	0.5µl	0.5µl	0.5µl	0.5µl	0.5µl	0.5µl
SPLIT and COMBINE								
Kupplung der 2. Aminosäureposition, dann Fmoc-Entschützung								
Tag	T14	T15	T14 / T13	T11	T12	T13	T9	T15/ T11
Tag	0.18mg	0.18mg	0.18 / 0.18mg	0.19mg	0.19mg	0.18mg	0.20mg	0.18/0.19mg
HOBt/	0.5mg	0.5mg	0.5mg	0.5mg	0.5mg	0.5mg	0.5mg	0.5mg
DIC (10 eq)	0.5µl	0.5µl	0.5µl	0.5µl	0.5µl	0.5µl	0.5µl	0.5µl
SPLIT and COMBINE								
Kupplung der 3. Aminosäureposition, dann Fmoc-Entschützung								
Tag	T8	T7	T8 / T6	T4	T3	T6	T2	T7 / T6
Tag	0.19mg	0.19mg	0.19 / 0.19mg	0.20mg	0.21mg	0.19mg	0.21mg	0.19/0.19mg
HOBt/	0.5mg	0.5mg	0.5mg	0.5mg	0.5mg	0.5mg	0.5mg	0.5mg
DIC (10 eq)	0.5µl	0.5µl	0.5µl	0.5µl	0.5µl	0.5µl	0.5µl	0.5µl
1.COMBINE, (2. Acetylierung), 3. Entschützung (TFA)								

Fortsetzung nächste Seite

[illegible]

15.2 Inkubation der 4096er Bibliothek (II)

Für alle folgenden Inkubationen wurde das acetylierte Bibliotheks-Harz verwendet.

15.2.1 Inkubation der 4096er Bibliothek (II) mit Fluorescein-markierter TARwt-RNA (TARwt-RNA*f*)

Zur Inkubation wurde die in Abb. 8.5 dargestellte TARwt-RNA (Biospring) eingesetzt. Zur besseren Handhabung wurde die Inkubation parallel in zwei Eppendorfcaps (2x 10 mg) durchgeführt. Nach Herstellerangaben entsprechen 125 mg trockenem Harz ca. 1 g gequollenem (Methanol) Harz. Dieses enthält 100 000 – 150 000 Harzkugeln. Bei Verwendung von 20 mg getrocknetem Harz ist der statischen Verteilung nach jede Sequenz mindestens viermal vertreten. Bei einer Kapazität des Harzes von 0.4 mmol/g entsprechen 20 mg Harz damit 8 µmol Tripeptiden.

10 mg Harz (4 µmol) der acetylierten 4096er Bibliothek (II) wurden in einem Eppendorfcap (DEPC-behandelt) mit 150 µl TK-Puffer x1 (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 20 mM KCl, 0.01% Triton X-100) versetzt und gequollen (5 min). Nach Abzentrifugieren wurde der Überstand entnommen und der Vorgang, nach Zusatz von jeweils 100 µl TK-Puffer x1, zweimal wiederholt. Zum Harz wurden anschließend nochmals 60 µl TK Puffer x1 gegeben, gefolgt von 0.571 nmol TARwt-RNA*f* (Verhältnis Tripeptid:RNA = 7000:1). Nach gründlichem Vortexen wurde das Harz nochmals zentrifugiert und unter Lichtabschluß (Aluminiumfolie) über Nacht (14 h) leicht geschüttelt. Nach der Inkubation wurde das Harz zunächst mit TK-Puffer x1 gewaschen (dreimal), mit einer Pasteurpipette auf dem Objektträger großflächig aufgetragen und mit der Heißluftpistole auf Kaltstufe bei Raumtemperatur (!!!) getrocknet. Unter dem Stereomikroskop wurden die hell leuchtenden Kugeln mit einer Präparationsnadel isoliert und jeweils in ein GC-Probenröhrchen überführt. Die einzelnen Harzkugeln wurden anschließend mit 10 µl MeOH (HPLC) versetzt, das Probenröhrchen mit einer Kappe verschlossen und für 4 Stunden unter der UV-Lampe (366 nm) bestrahlt. Die Retention des freigesetzten Alkohols wurde mit dem Gaschromatographen detektiert. In der folgenden Tabelle (Tab. 15.3) sind die identifizierten Tripeptide aus der Inkubation mit TARwt-RNA*f* aufgelistet. Die zugehörige statistische Verteilung der einzelnen Aminosäuren pro Position ist in Tabelle 9.5 und die entsprechende Graphik in Abb. 9.6 dargestellt.

Tab. 15.3: Identifizierte Tripeptide aus der Inkubation mit TARwt-RNAfl (4096er Bibliothek (II))

Nr.	Tag			Sequenz (C→NHAc)		
1	20/17	15/11	4/2	D-pyrazinyl	D-2pyridyl	D-2pyrim
2	x	14/11	8/2	x	D-3pyridyl	Chinolin
3	19/17	11	7/6	D-2pyrim	D-Phe	D-2pyridyl
4	x	15/11	6/2	x	D-2pyridyl	D-pyrazinyl
5	x	15/11	7/2	x	D-2pyridyl	L-pyrazinyl
6	19	15/9	2	D-Phe	L-pyrazinyl	L-Asn
7	21/20	15/11	4/2	D-2pyridyl	D-2pyridyl	D-2pyrim
8	x	15/9	6/2	x	L-pyrazinyl	D-pyrazinyl
9	21/17	11	7	L-pyrazinyl	D-Phe	L-Lys
10	21	11/9	2	L-Lys	D-2pyrim	L-Asn
11	x	15/11	4/2	x	D-2pyridyl	D-2pyrim
12	20	x	6/4	His	x	L-Naphthyl
13	20/19	15/11	6/4	Naphthyl	D-2-pyridyl	Naphthyl
14	20	15/9	4/2	His	L-pyrazinyl	D-2pyrim
15	19/17	15/11	7/6	D-2pyrim	D-2pyridyl	D-2pyridyl
16	20/17	11	7/3	D-pyrazinyl	D-Phe	NaphtOMe
17	20/17	14/11	7/3	D-pyrazinyl	D-3pyridyl	NaphtOMe
18	17	11/9	7/6	D-Asn	D-2pyrim	D-2pyridyl
19	21/17	x	8/3	L-pyrazinyl	x	Phenanth
20	22/20	15/11	8/2	D-Arg	D-2pyridyl	Chino
21	21/20	15/9	2	D-2pyridyl	L-pyrazinyl	D-Asn
22	22/20	15/11	8/2	D-Arg	D-2pyridyl	Chinolin
23	21/20	15/9	7	D-2pyridyl	L-pyrazinyl	L-Lys
24	x	15/11	6	x	D-2pyridyl	D-His
25	21/17	11	7/6	L-pyrazinyl	D-Phe	D-2pyridyl
26	17	13/9	6/2	L-Asn	D-pyrazinyl	D-pyrazinyl
27	20/19	15/9	7/2	L-Naphthyl	L-pyrazinyl	L-pyrazinyl
28	21/17	14/11	8/2	L-pyrazinyl	D-2pyridyl	Chinolin

Nr.	Tag			Sequenz (C→NHAc)		
29	18	15/11	4/2	D-Leu	D-2pyridyl	D-2pyrim
30	21/20	13/9	7/2	D-2pyridyl	D-pyrazinyl	L-pyrazinyl
31	20/19	14/12	7	L-Napht	L-Phenanth	L-Lys
32	20/19	11/9	7/6	L-Napht	D-2pyrim	D-2pyridyl
33	x	15/9	7/6	x	L-pyrazinyl	D-2pyridyl
34	21/20	13/11	7/6	D-2pyridyl	L-Napht	D-2pyridyl
35	20	15/11	4/2	His	D-2pyridyl	D-2pyrim
36	21/20	9	2	D-2pyridyl	L-Asn	L-Asn
37	x	15/11	4/2	x	D-2pyridyl	D-2pyrim
38	19	11/9	7/6	D-Phe	D-2pyrim	D-2pyridyl
39	17	11/9	7/6	L-Asn	D-2pyrim	D-2pyridyl
40	19/17	x	7/6	D-2pyrim	x	D-2pyridyl
41	17	13/9	7/6	L-Asn	D-pyrazinyl	D-2pyridyl
42	21	11	7/6	L-Lys	D-Phe	D-2pyridyl
43	22/19	11	7	D-3pyridyl	D-Phe	L-Lys
44	17/22	13	3	Chinolin	His	D-Leu
45	19	13/11	7	D-Phe	L-Napht	L-Lys
46	22/19	9	6/4	D-3pyridyl	L-Asn	L-Naphth
47	20/17	12	7/2	D-pyrazinyl	D-Leu	L-pyrazinyl
48	20/21	13/11	4/2	D-2pyridyl	L-Naphthyl	D-2pyrim

*hervorgehobene Tripeptide wurden neu synthetisiert und im *in vitro* Assay auf ihre Bindungseigenschaften vermessen

15.3 Inkubation mit RNA Mutanten

15.3.1 Inkubation der 4096er Bibliothek (II) mit Fluorescein-markierter TARbulgeless-RNA (TAR bl -RNA fl)

Die Inkubation der acetylierten 4096er Bibliothek (II) mit TAR bl -RNA fl erfolgte analog zur Inkubation mit TAR w t -RNA fl . Es wurden 0.571 nmol TAR bl -RNA fl zur Inkubation verwendet. Die identifizierten Tripeptidsequenzen sind in Tabelle Tab. 15.4 aufgelistet. Die statistische Verteilung der Aminosäuren pro Position ist in Tab. 15.5, die entsprechende Graphik in Abb. 9.8 dargestellt.

Tab. 15.4: Identifizierte Tripeptide nach Inkubation mit TAR bl -RNA fl (4096er Bibliothek (II))

Nr.	Tag			Sequenz (C→NHAc)		
1	17	15/11	4/2	L-Asn	D-2pyridyl	D-2pyrim
2	x	13	7/6	x	D-His	D-2pyridyl
3	x	14/11	7/6	x	D-3pyridyl	D-2pyridyl
4	19/17	13	7/6	D-2pyrim	D-His	D-2pyrim
6	21	x	7/6	L-Lys	x	D-2pyridyl
7	17	11/9	7/6	L-Asn	D-2pyrim	D-2pyridyl
8	18	15/11	4/2	D-Leu	D-2pyridyl	D-2pyrim
9	21/17	x	7	L-pyrazinyl	x	L-Lys
10	19	15/11	x	D-Phe	D-2pyridyl	x
11	20/17	14	8/3	D-pyrazinyl	D-Lys	L-Phenanth
12	21	14/11	7	L-Lys	D-3pyridyl	L-Lys
13	21/20	14/11	8/6	D-2pyridyl	D-3pyridyl	D-Arg
14	21/20	x	7	D-2pyridyl	x	L-Lys
15	21	x	6	L-Lys	x	His
16	20/19	15/9	x	L-Naphth	L-pyrazinyl	x
17	21	13/9	7/6	L-Lys	D-pyrazinyl	D-2pyridyl
18	19	15/9	6	D-Phe	L-pyrazinyl	L-His
19	21/17	11	x	L-pyrazinyl	D-Phe	x
20	19	14	x	D-Phe	D-Lys	x

*hervorgehobene Tripeptide wurden neu synthetisiert und im *in vitro* Assay auf ihre Bindungseigenschaften vermessen

Tab. 15.5: Statistische Verteilung der Aminosäuren pro Position bei Inkubation mit TARwt-RNAfl und TARbl-RNAfl (4096er Bibliothek (II))

Aminosäure	TARwt-RNAfl			TARbl-RNAfl		
	Position			Position		
	1	2	3	1	2	3
D-Lys	0	0	0	0	2	0
L-Lys	1	0	2	4	0	3
D-Arg	1	0	0	0	0	1
D-Phe	1	4	0	3	1	0
D-Leu	1	0	0	1	0	0
D-His	2	0	1	0	2	2
L-Asn	2	0	3	2	0	0
D-2Pyridyl	4	12	4	2	1	0
D-3Pyridyl	0	2	0	0	3	0
D-2Pyrim	2	2	5	2	1	3
D-Pyrazinyl	3	1	3	1	1	0
L-Pyrazinyl	4	6	3	2	2	0
L-Phenanth	0	0	1	0	0	1
L-Naphth	2	0	2	1	0	0
L-NaphthOMe	0	0	2	0	0	0
L-Chino	0	0	4	0	0	0

15.3.2 Inkubation der 4096er Bibliothek (II) mit Fluorescein-markierter Bcr-Abl-mRNA (Bcr-Abl-mRNAfl)

Auch die Inkubation der Bibliothek mit Bcr-Abl-mRNAfl erfolgte analog zur oben beschriebenen Methode. Es wurden 0.571 nmol Bcr-Abl-mRNAfl eingesetzt. Die identifizierten Tripeptide sind in Tabelle Tab. 15.6 dargestellt. Die statistische Verteilung der drei Aminosäurepositionen sind in Tabelle Tab. 15.8 Graphik Abb. 9.11 gezeigt.

Tab. 15.6: Identifizierte Tripeptide der Inkubation mit Bcr-Abl-mRNAfl (4096er Bibliothek II)

Nr.	Tag			Sequenz (C→NHAc)		
1	22/19	13/11	7/6	D-3pyridyl	L-Napht	D-2pyridyl
2	17	13	8/2	L-Asn	D-His	L-Chino
3	21	14/11	3	L-Lys	D-3pyridyl	D-Leu
4	20/21	13/9	2	D-2pyridyl	D-pyrazinyl	L-Asn
5	19/17	15/9	7/6	D-2pyrim	L-pyrazinyl	D-2pyridyl
6	17	11	7/2	L-Asn	D-Phe	L-pyrazinyl
7	22/19	11	6/8	D-3pyridyl	D-Phe	D-Arg
8	21	15/9	7/6	L-Lys	L-pyrazinyl	D-2pyridyl
9	20/17	14/9	4/2	D-pyrazinyl	L-Chino	D-2pyrim
10	x	14/11	7/6	x	D-3pyridyl	D-2pyridyl
11	x	15/11	8/2	x	D-2pyridyl	Chino
12	20	15/11	8/3	D-His	D-2pyridyl	L-Phenanth
13	20	15/11	7/2	D-His	D-2pyridyl	L-pyrazinyl
14	21	13	8/2	L-Lys	D-His	L-Chino
15	19/17	12	7/6	D-2pyrim	D-Leu	D-2pyridyl
16	x	11	7/2	x	D-Phe	L-pyrazinyl
17	x	11	8/2	x	D-Phe	L-Chino
18	20/17	15/12	7/3	D-pyrazinyl	NaphthylOMe	NaphtylOMe
19	17	15/11	7/6	L-Asn	D-2pyridyl	D-2pyridyl
20	20/19	15/12	7/6	L-Napht	L-NaphtOMe	D-2pyridyl
21	22/19	15/11	4/2	D-3pyridyl	D-2pyridyl	D-2pyrim
22	22/19	15/11	8/6	D-3pyridyl	D-2pyridyl	D-Arg

15.3.3 Inkubation der 4096er Bibliothek (II) mit Fluorescein-markierter ψ -RNA (ψ -RNAfl)

Die Inkubation der 4096er Bibliothek (II) mit ψ -RNAfl erfolgte analog zur oben beschriebenen Methode. In der Inkubation wurden 0.571 nmol ψ -RNAfl eingesetzt. Die identifizierten Tripeptidsequenzen sind in Tabelle Tab. 15.7 aufgelistet. Die statistische Verteilung der Aminosäuren pro Position ist in Tab 15.8, die zugehörige Graphik Abb. 9.13 dargestellt.

Tab. 15.7: Identifizierte Tripeptide aus der Inkubation mit ψ -RNAfl (4096er Bibliothek(II))

Nr.	Tag			Sequenz (C→NHAc)		
1	22	15/9	2	D-Lys	L-pyrazinyl	L-Asn
2	17	13/9	8/6	L-Asn	D-pyrazinyl	D-Arg
3	17	13/9	2	L-Asn	D-pyrazinyl	L-Asn
4	22/19	15/11	8/2	D-3pyridyl	D-2pyridyl	L-Chino
5	21/17	15/11	7/2	L-pyrazinyl	D-2pyridyl	L-pyrazinyl
6	17	15/11	7/6	L-Asn	D-2pyridyl	D-2pyridyl
7	x	13/9	4/8	x	D-pyrazinyl	D-3pyridyl
8	21/20	14/9	4	D-2pyridyl	L-Chino	D-Phe
9	x	11	8/4	x	D-Phe	D-3pyridyl
10	20	13/9	8/2	D-His	D-pyrazinyl	L-Chino
11	21/20	15/11	6/4	D-2pyridyl	D-2pyridyl	L-Naphth
12	21/17	13/11	6/4	L-pyrazinyl	L-Naphth	L-Napht
13	21	15/11	8/2	L-Lys	D-2pyridyl	L-Chino
14	20	13/9	2	D-His	D-pyrazinyl	L-Asn
15	19/17	9	6/2	D-2pyrim	L-Asn	D-Pyra
16	20/17	15/11	6/4	D-pyrazinyl	D-2pyridyl	L-Naphth
17	x	14/9	7/6	x	L-Chino	D-2pyridyl
18	19/17	13	4	D-2pyrim	D-His	D-Phe

Tab. 15.8: Statistische Verteilung der Aminosäuren pro Position bei Inkubation mit Bcr-Abl-mRNAfl und ψ -RNAfl (4096er Bibliothek (II))

Aminosäure	Bcr-Abl-m RNAfl			psi RNAfl		
	Position			Position		
	1	2	3	1	2	3
D-Lys	0	0	0	1	0	0
L-Lys	3	0	0	1	0	0
D-Arg	0	0	2	0	0	1
D-Phe	0	4	0	0	1	2
D-Leu	0	1	1	0	0	0
D-His	2	2	0	2	1	0
L-Asn	3	0	1	3	1	3
D-2Pyridyl	1	6	7	2	6	2
D-3Pyridyl	4	2	0	1	0	2
D-2Pyrim	2	0	2	2	0	0
D-Pyrazinyl	2	1	0	1	5	1
L-Pyrazinyl	0	2	3	2	0	1
L-Phenanth	0	0	1	0	0	0
L-Naphth	0	1	1	0	0	3
L-NaphthOMe	0	2	1	0	0	0
L-Chino	0	1	4	0	2	3

15.4 Herstellung der 343er Bibliothek

Zur Herstellung der Bibliothek wurden folgende Standard-Aminosäuren eingesetzt:

Fmoc-D-Lys(Boc)OH, Fmoc-L-Lys(Boc)OH, Fmoc-D-Arg(Pmc), Fmoc-L-PheOH, Fmoc-L-LeuOH, Fmoc-L-His(Trt)OH, Fmoc-L-Arg(Pbf)

Die Synthese der 343er Bibliothek erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie für die 4096er Bibliothek (II). Pro Spritze wurden jedoch 50 mg getrocknetes PEGA Harz (Kapazität 0.4 mmol/g) verwendet. Das Synthese und Kodierungsschema der 343er Bibliothek ist in Tabelle Tab. 15.10 abgebildet. Auch bei dieser Bibliothek wurde der N-Terminus acetyliert. Hierzu wurden 150 mg der zuvor getrockneten Bibliothek in einer 2 ml Spritze mit Filter eingewogen und mit 1,5 ml Acetylierungsreagenz versetzt ($\text{Ac}_2\text{O}:\text{DCM}$ 20:80 + 10 mg DMAP/100 ml). Nach 4 Stunden wurde die Vollständigkeit der Acetylierung durch den Kaisertest überprüft. Bei negativem Ergebnis wurde das Harz abschließend mit CH_2Cl_2 gewaschen und getrocknet. Zur Abspaltung der Schutzgruppen wurde eine Lösung aus TFA:TIS: H_2O (95:2.5:2.5) verwendet. Nach 24 h wurde die Abspalllösung durch frisches Reagenz ersetzt und das Harz nochmals für 1 h damit behandelt. Anschließend wurde die Bibliothek ausgiebig in der Reihenfolge: CH_2Cl_2 (fünfmal), DMF (fünfmal), MeOH (fünfmal) und CH_2Cl_2 (fünfmal) gewaschen und abschließend im Vakuum getrocknet.

15.5 Inkubation der 343er Bibliothek mit verschiedenen RNAs

In allen hier nachfolgend beschriebenen Inkubationen wurde acetyliertes Bibliotheks-Harz (Kapazität 0.4 mmol/g) verwendet.

15.6 Inkubation der 343er Bibliothek mit der TARwt-RNAfl

Für eine erfolgreiche Inkubation mußte ein Verhältnis von Tripeptid : RNA von 700 : 1 eingehalten werden. Deshalb wurde als „Verdünnungskomponente“ acetyliertes PEGA Harz hinzugefügt. Das unbeladene Amino PEGA Harz wurde nach der bereits in Kap. 15.1.1 beschriebenen Methode zur Acetylierung hergestellt. Zur Inkubation wurden in einem Eppendorfcap 2 mg (entspricht 0.8 µmol Tripeptiden) der Bibliothek und 18 mg unbeladenes acetyliertes Harz mit 200 µl TK-Puffer x1 versetzt. Nach Abzentrifugieren wurde der Überstand entnommen und der Vorgang zweimal wiederholt. Abschließend wurden das Volumen auf insgesamt 200 µl-TK Puffer x1 ergänzt, die Probe kurz anzentrifugiert und in den Überstand 1.14 nmol TARwt-RNAfl pipettiert. Die Inkubation erfolgte unter Lichtausschluß über 14 h. Die Isolierung und Identifizierung der Tripeptidsequenzen wurde analog zur beschriebenen Methode (vgl. Kap. 15.2.1) durchgeführt. Folgende Tripeptidsequenzen konnten detektiert werden (Tab. 15. 11). Die statistische Verteilung der Aminosäuren pro Position ist in Tabelle Tab. 15.12, die zugehörige Graphik ist in Abb. 9.14 dargestellt.

Tab. 15.10: Identifizierte Tripeptide aus der Inkubation mit TARwt-RNAfl (343er Bibliothek)

Nr.	Tag			Sequenz (C→NHAc)		
1	19	9	3	L-Phe	L-Arg	L-Leu
2	22	14/13	8	D-Lys	D-Arg	D-Arg
3	22	9	4	D-Lys	L-Arg	L-Phe
4	19	14/13	4	D-Lys	D-Arg	L-Phe
5	22	9	4	D-Lys	L-Arg	L-Phe
6	x	11	7	x	L-Phe	L-Lys
7	19	9	x	L-Phe	L-Arg	x
8	19	14	6	L-Phe	D-Lys	L-His
9	19	9	4	L-Phe	L-Arg	L-Phe
10	19	9	4	L-Phe	L-Arg	L-Phe

Nr.	Tag			Sequenz (C→NHAc)		
11	x	14/13	4	x	D-Arg	L-Arg
12	18	14/13	8	L-Leu	D-Arg	D-Arg
13	x	11	x	x	L-Phe	x
14	20	14/13	4	L-His	D-Arg	L-Phe
15	22	11	4	D-Lys	L-Phe	L-Phe
16	22	11	6	D-Lys	L-Phe	L-His
17	18	15/9	4	L-Leu	L-Leu	L-Phe
18	x	14/ 13	6/4	x	D-Arg	L-Arg
19	22	14/13	4	D-Lys	D-Arg	L-Phe
20	x	14/13	6/4	x	D-Arg	L-Phe
21	19	14/13	x	L-Phe	D-Arg	x
22	19	14/13	4	L-Phe	D-Arg	L-Phe
23	19	14/13	x	L-Phe	D-Arg	x
24	17	14/13	4	L-Arg	D-Arg	L-Phe
25	x	9/11	4	x	L-His	L-Phe

*hervorgehobene Tripeptide wurden neu synthetisiert und im *in vitro* Assay auf ihre Bindungseigenschaften vermessen

Tab. 15.11: Statistische Verteilung der Aminosäure pro Position bei Inkubation der 343er Bibliothek mit TARwt-RNAfl

	Aminosäuren						
	D-Lys	L-Lys	D-Arg	L-Phe	L-Leu	L-His	L-Arg
Position 1	7	0	0	8	2	1	1
Position 2	1	0	12	3	1	1	6
Position 3	0	1	2	13	1	2	1

15.7 Inkubation der 343er Bibliothek mit RNA Mutanten

Das acetylierte Bibliotheks-Harz wurde mit den RNA-Mutanten *TARloopless-RNAfl* (*TARll-RNAfl*) und *TARbulgeless-RNAfl* (*TARbl-RNAfl*) sowie den T₁₀-Linker (*T₁₀fl*) unter den bereits beschriebenen und variierten Bedingungen inkubiert.

15.7.1 Inkubation mit der *TARloopless-RNAfl* (*TARll-RNAfl*)

Die Inkubation der Bibliothek mit der loopless Mutante wurde analog zur Inkubation mit *TARwt-RNAfl* durchgeführt. Es wurden 1.14 nmol *TARll-RNAfl* eingesetzt. Die identifizierten Tripeptidsequenzen sind in der Tabelle 15.13 dargestellt. Die statistische Verteilung der Aminosäuren pro Position ist in Tab. 15.14, die entsprechende Graphik (Abb. 9.16) gezeigt.

Tab. 15.12: Identifizierte Tripeptide aus der Inkubation mit *TARll-RNAfl* (343er Bibliothek)

Nr.	Tag			Sequenz (C→NHAc)		
1	18	14	6	L-Leu	D-Arg	L-His
2	19	9	6	L-Phe	L-Arg	L-His
3	20	9	7	L-His	L-Arg	L-Lys
4	22	11	6	D-Lys	L-Phe	L-His
5	22	11	6	D-Lys	L-Phe	L-His
6	19	x	x	D-Phe	x	x
7	20/22	15/9	6/4	L-Lys	L-Leu	L-Arg
8	x	11/9	x	x	L-His	x
9	17	11	x	L-Arg	L-Phe	x
10	20	11	6	L-His	L-Phe	L-His
11	18	x	6/4	L-Leu	x	D-Arg
12	20	11	x	L-His	L-Phe	x
13	22	11/9	4	D-Lys	L-His	L-Phe
14	x	11	3	x	L-Phe	L-Leu
15	18	14/13	x	L-Leu	D-Arg	x
16	22	15/9	6	D-Lys	L-Leu	L-His

Nr.	Tag			Sequenz (C→NHAc)		
17	x	15/9	6	x	L-Leu	L-His
18	22	11/9	4	D-Lys	L-His	L-Phe
19	22	14/13	4	D-Lys	D-Arg	L-Phe
20	19	9	7	L-His	L-Arg	L-Lys
21	x	11	6	x	L-Phe	L-His
22	22	11	6	D-Lys	L-Phe	L-His
23	22/20	15/9	6/4	D-Arg	L-Leu	L-Arg
24	19	x	7	L-Phe	x	L-Lys
25	20	11/9	4	L-His	L-His	L-Phe
26	x	14/13	6	x	D-Arg	L-His

Tab. 15.13: Statistische Verteilung der Aminosäuren pro Position bei Inkubation der 343er Bibliothek mit TARII-RNAfl

	Aminosäuren						
	D-Lys	L-Lys	D-Arg	L-Phe	L-Leu	L-His	L-Arg
Position 1	7	1	1	3	4	5	0
Position 2	0	0	4	8	1	4	3
Position 3	0	3	1	3	5	10	2

15.7.2 Inkubation der 343er Bibliothek mit der TARbulgeless-RNAfl (TARbl-RNAfl)

Die Inkubation der Bibliothek mit der TARbulgeless-RNAfl wurde analog zur Inkubation mit TARwt-RNAfl durchgeführt. Es wurden 1.14 nmol TARbl-RNAfl eingesetzt. Die identifizierten Tripeptide sind in der Tabelle Tab. 15.15 aufgelistet. Die statistische Verteilung der Aminosäuren pro Position ist in Tab. 15.16, die entsprechende Graphik in Abb. 9.15 dargestellt.

Tab. 15.14: Identifizierte Tripeptide aus der Inkubation mit TARbl-RNAfl (343er Bibliothek)

Nr.	Tag			Sequenz (C→NHAc)		
1	19	9	x	L-Phe	L-Arg	x
2	x	14/13	7	x	D-Arg	L-Lys
3	22	9	6/4	D-Lys	L-Arg	L-Arg
4	x	11/9	6	x	L-His	L-His
5	x	11	7	x	L-Phe	L-Lys
6	19	11	7	L-Phe	L-Phe	L-Lys
7	22	11/9	7	L-Lys	L-His	L-Lys
8	20	11/9	x	L-His	L-His	x
9	22	11/9	6/4	D-Lys	L-His	L-Arg
10	x	11/9	7	x	L-His	L-Lys
11	x	11/9	6/4	x	L-His	L-Arg
12	x	11/9	4	x	L-His	L-Phe
13	22	x	7	D-Lys	x	L-Lys
14	20	11/9	6	L-His	L-His	L-His
15	19	9	4	L-Phe	L-Arg	L-Phe
16	18	11	6	L-Leu	L-Phe	L-His
17	22	11/9	4	D-Lys	L-His	L-Phe
18	20	15/9	x	L-His	L-Leu	x
19	20	x	3	L-His	x	L-Leu
20	18	11/9	3	L-Leu	L-His	L-Leu
21	20	11	x	L-His	L-Phe	x
22	x	11	6	x	L-Phe	L-His
23	18	11	6	L-Leu	L-Phe	L-His
24	19	11/9	6/4	L-Phe	L-His	L-Arg
25	22/20	x	6	L-Lys	x	L-His
26	x	11	x	x	L-Phe	x
27	20	15/9	4	L-His	L-Leu	L-Phe
28	19	x	7	L-Phe	x	L-Lys
29	20	15/9	4	L-His	L-Leu	L-Phe

Nr.	Tag			Sequenz (C→NHAc)		
30	20	11	7	L-His	L-Phe	L-Lys
31	22	11/9	4	D-Lys	L-His	L-Phe
32	22/20	11/9	x	D-Arg	L-His	?
33	19	11/9	4	L-Phe	L-His	L-Phe
34	22	x	3	D-Lys	x	L-Leu
35	20	11	x	L-His	L-Phe	x
36	19	9	x	L-Phe	L-Arg	x
37	18	x	7	L-Leu	x	L-Lys
38	18	14/13	7	L-Leu	D-Arg	L-Lys
39	x	9	6/4	x	L-Arg	D-Arg
40	18	14/13	7	L-Leu	D-Arg	L-Lys
41	19	14/13	7	L-Phe	D-Arg	L-Lys
42	x	9/11	4	x	L-His	L-Phe
43	20	9/11	6	L-His	L-His	L-His
44	x	11	6/4	x	L-Phe	L-Lys

*hervorgehobene Tripeptide wurden neu synthetisiert und im *in vitro* Assay auf ihre Bindungseigenschaft vermessen

Tab. 15.15: Statistische Verteilung der Aminosäuren pro Position bei Inkubation der 343er Bibliothek mit TARbl-RNAfl

	Aminosäuren						
	D-Lys	L-Lys	D-Arg	L-Phe	L-Leu	L-His	L-Arg
Position 1	6	2	1	7	6	10	0
Position 2	0	0	4	10	3	16	5
Position 3	3	10	1	8	2	7	4

15.7.3 Inkubation der 343er Bibliothek mit dem T₁₀fl-Linker

Die Inkubation der Bibliothek mit dem T10 Linker wurde analog zur Inkubation mit TARwt-RNAfl durchgeführt. Es wurden 1.14 nmol T₁₀fl-Linker eingesetzt. Bei dieser Inkubation wurden keine leuchtenden Kugeln isoliert.

15.7.4 Inkubation der 343er Bibliothek mit der TARwt-RNAfl (TARwt-RNAfl) in Gegenwart von CONH₂-L-His-L-His-L-HisNH₂ (100 eq)

Die Inkubation wurde analog zur Inkubation mit TARwt-RNAfl durchgeführt. Neben der Zugabe von 1.14 nmol TARwt-RNAfl wurde das Harz (0.8 µmol) zusätzlich mit CONH₂-L-His-L-His-L-HisNH₂ (80 µmol, 100 eq) versetzt. Beim Auslesen der Kugeln wurden hierbei weniger hell leuchtende Kugeln wahrgenommen. Desweiteren konnte eine Differenzierung in der Helligkeit der Kugeln beobachtet werden. Weniger stark leuchtende Kugeln sind in der Tabelle in Nr. 17-19 dargestellt. Die identifizierten Tripeptidsequenzen sind in Tab. 15.17 aufgelistet. Die statistische Verteilung der Aminosäuren pro Position ist in Tab 15.18, die zugehörige Graphik in Abb. 9.17 dargestellt.

Tab. 15.16: Identifizierte Tripeptide aus der Inkubation mit TARwt-RNAfl (343er Bibliothek) in Gegenwart von 100 eq CONH₂-L-His-L-His-L-HisNH₂

Nr.	Tag			Sequenz (C→NHAc)		
1	x	12	3	x	L-Lys	L-Leu
2	22	9	x	D-Lys	L-Arg	x
3	19	x	x	L-Phe	x	x
4	x	15/9	x	x	L-Leu	x
5	21	x	7	D-Arg	x	L-Lys
6	21	9	7	D-Arg	L-Arg	L-Lys
7	x	11	4	x	L-Phe	L-Phe
8	17	x	4	L-Arg	x	L-Phe
9	18	x	4	L-Leu	x	L-Phe
10	21	14/13	7	D-Arg	D-Arg	L-Lys
11	17	9	4	L-Arg	L-Arg	L-Phe
12	17	11	7	L-Arg	L-Phe	L-Lys

Nr.	Tag			Sequenz (C→NHAc)		
13	21	x	7	D-Arg	x	L-Lys
14	21	9	7	D-Arg	L-Arg	L-Lys
15	21	9	4	D-Arg	L-His	L-Phe
16	17		6	L-Arg	x	L-His
17	x	11	6	x	L-Phe	L-His
18	x	12	7	x	L-Lys	L-Lys
19	17	14/13	7	L-Arg	D-Arg	L-Lys

Tab. 15.17: Statistische Verteilung der Aminosäuren pro Position bei Inkubation der 343er Bibliothek mit TARwt-RNAfl in Gegenwart von 100 eq CONH₂-L-His-L-His-L-HisNH₂

	Aminosäuren						
	D-Lys	L-Lys	D-Arg	L-Phe	L-Leu	L-His	L-Arg
Position 1	1	0	6	1	1	0	5
Position 2	0	2	2	3	1	1	4
Position 3	0	8	0	5	1	2	0

15.7.5 Inkubation der 343er Bibliothek mit TARwt-RNAfl im Medium 40 : 60 MeOH:TK Puffer

Die Inkubation erfolgte analog zur Inkubation mit TARwt-RNAfl. Das Harz wurde jedoch mit dem Medium MeOH:TK-Puffer (40:60) versetzt. Die identifizierten Tripeptide sind in der Tabelle Tab. 15.19 aufgelistet. Die statistische Verteilung der Aminosäuren pro Position ist in Tab. 15.20, die entsprechende Graphik in Abb. 9.18 dargestellt.

Tab. 15.18: Identifizierte Tripeptide aus der Inkubation mit TARwt-RNAfl (343er Bibliothek) in Gegenwart eines MeOH:TK-Puffers

Nr.	Tag			Sequenz (C→NHAc)		
1	17	12	x	L-Arg	L-Lys	x
2	18	14/13	x	L-Leu	D-Arg	x
3	19	13/14	x	L-Phe	D-Arg	x
4	x	14/13	x	x	D-Arg	x
5	17	9	7	L-Arg	L-Arg	L-Lys
6	18	14/13	x	L-Leu	D-Arg	x
7	18	14/13	3	L-Leu	D-Arg	L-Leu
8	21	13/14	7	D-Arg	D-Arg	L-Lys
9	17	11	4	L-Arg	L-Phe	L-Phe
10	17	x	3	L-Arg	x	L-Leu
11	x	9	3	x	L-Arg	L-Leu
12	17	11	4	L-Arg	L-Phe	L-Phe
13	17	x	x	L-Arg	x	x
14	x	9	4	x	L-Arg	L-Phe
15	21	12	7	D-Arg	L-Lys	L-Lys
16	x	x	6/4	x	x	L-Arg

Tab. 15.19: Statistische Verteilung der Aminosäuren pro Position bei Inkubation der 343er Bibliothek mit TARwt-RNAfl bei variiertem Puffergemisch

	Aminosäuren						
	D-Lys	L-Lys	D-Arg	L-Phe	L-Leu	L-His	L-Arg
Position 1	0	0	2	1	3	0	6
Position 2	0	2	6	2	0	0	3
Position 3	0	3	0	3	3	0	1

15.7.6 Inkubation der 343er Bibliothek mit TARwt-RNAfl in Gegenwart einer erhöhten Salzkonzentration

Die Inkubation erfolgte wie beschrieben, jedoch in Gegenwart einer erhöhten Salzkonzentration. Auch bei dieser Inkubation wurde der TK-Puffer x1 verwendet, dem zusätzlich NaCl zugesetzt wurde, wobei sich eine Konzentration von 20 mM KCl und 130 mM NaCl ergab.

Es zeigte sich eine Differenzierung in der Leucht-Intensität der fluoreszierenden Kugeln, die Sequenzen der Einträge 1 und 2 (vgl. Tab. 15.21) leuchteten bei der Inkubation intensiver als die folgenden. Die identifizierten Tripeptidsequenzen sind in der Tabelle Tab. 15.21 dargestellt. Die statistische Verteilung der Aminosäuren pro Position ist in Tabelle Tab. 15.22, die entsprechende Graphik in Abb. 9.19 gezeigt.

Tab. 15.20: Identifizierte Tripeptide aus der Inkubation mit TARwt-RNAfl (343er Bibliothek) in Gegenwart einer erhöhten Salzkonzentration

Nr.	Tag			Sequenz (C→NHAc)		
1	20	12	x	L-His	L-Lys	x
2	20	12	6	L-His	L-Lys	L-His
3	22	9/15	6	D-Lys	L-Leu	L-His
4	19	x	7	L-Phe	x	L-Lys
5	21	14/13	x	D-Arg	D-Arg	x
6	x	x	6/4	x	x	L-Arg
7	x	14/13	6	x	D-Arg	L-His
8	x	x	7	x	x	L-Lys
9	x	12	4	x	L-Lys	L-Phe
10	x	9	4	x	L-Arg	L-Phe
11	x	13/14	6/4	x	D-Arg	L-Arg
12	x	9	6/4	x	L-Arg	L-Arg
13	21	9	4	D-Arg	L-Arg	L-Phe
14	20	11/9	4	L-His	L-His	L-Phe
15	x	13/14	7	x	D-Arg	L-Lys
16	22	13/14	8	D-Lys	D-Arg	D-Arg
17	x	9	6/4	x	L-Arg	L-Arg
18	x	13/14	7	x	D-Arg	L-Lys

Tab. 15.21: Statistische Verteilung der Aminosäure pro Position bei Inkubation der 343er Bibliothek mit TARwt-RNAfl bei erhöhter Salzkonzentration

	Aminosäuren						
	D-Lys	L-Lys	D-Arg	L-Phe	L-Leu	L-His	L-Arg
Position 1	2	0	2	1	0	3	0
Position 2	0	3	6	0	1	1	4
Position 3	0	4	1	4	0	3	4

15.7.7 Inkubation der 343er Bibliothek mit TARwt in Gegenwart von D-Arg-D-Arg-D-Arg (100 eq)

Durchführung der Inkubation analog zur Inkubation mit der TARwt-RNAfl es wurden jedoch zusätzlich 100 eq CONH₂-D-Arg-D-Arg-D-ArgNH₂ (80 µM) zugesetzt. Die identifizierten Tripeptide sind in der Tabelle Tab. 15.23 aufgelistet. Die statistische Verteilung der Aminosäuren pro Position ist in Tab. 15.24, die entsprechende Graphik in Abb. 9.20 dargestellt.

Tab. 15.22: Identifizierte Tripeptide aus der Inkubation mit TARwt-RNAfl (343er Bibliothek) in Gegenwart von 100 eq CONH₂-D-Arg-D-Arg-D-ArgNH₂

Nr.	Tag			Sequenz (C→NHAc)		
1	x	9	6/4	x	L-Arg	L-Arg
2	x	15/9	4	x	L-Leu	L-Phe
3	22/20	11/9	4/6	L-Lys	L-His	L-Arg
4	22	14/13	8/6	D-Lys	D-Arg	D-Lys
5	19	9	4/6	L-Phe	L-Arg	D-Arg
6	18	12	x	L-Leu	L-Lys	x
7	x	11/9	7	x	L-His	L-Lys
8	22	9	4/6	D-Lys	L-Arg	L-Arg
9	19	9	4	L-Phe	L-Arg	L-Phe
10	x	11/9	4/6	x	L-His	L-Arg
11	x	11/9	4	x	L-His	L-Phe
12	18	x	x	L-Leu	x	x
13	19	x	6/4	L-Phe	x	L-Arg

Nr.	Tag			Sequenz (C→NHAc)		
14	18	9	4	L-Leu	L-Arg	L-Phe
15	20	x	x	L-His	x	x
16	20	9/11	4	L-His	L-His	L-Phe
17	20	9/11	4	L-His	L-His	L-Phe
18	19	9/11	7	L-Phe	L-His	L-Lys
19	x	15/9	4	x	L-Leu	L-Phe
20	22	15/9	6/4	D-Lys	L-Leu	L-Arg
21	22	11/9	4	D-Lys	L-His	L-Phe
22	19	x	6	L-Phe	x	L-His
23	18	9/11	6/4	L-Leu	L-His	L-Arg
24	22	15/9	4	D-Lys	L-His	L-Phe
25	20	x	4	L-His	x	L-Phe
26	19	9	4	L-Phe	L-Arg	L-Phe

Tab. 15.23: Statistische Verteilung der Aminosäure pro Position bei Inkubation der 343er Bibliothek mit TARwt-RNAfl in Gegenwart von CONH₂-D-Arg-D-Arg-D-ArgNH₂

	Aminosäuren						
	D-Lys	L-Lys	D-Arg	L-Phe	L-Leu	L-His	L-Arg
Position 1	5	1	0	6	4	4	0
Position 2	0	1	1	0	3	10	6
Position 3	1	2	1	11	0	1	7

16 Anhang

16.1 Literaturverzeichnis

- [1] Medinger, M., Soltau, J., Unger, C., Dreves, J., *MMP* **2004**, 27, 2, 50-58.
- [2] Govindan, R. , *Clin. Cancer Res.* **2004**, 10, 4241-4244.
- [3] a) Hermann, T., *Angew. Chem.* **2000**, 112, 1962-1979.
b) Zaman, G. J. R., Michiels, P. J. A., van Boeckel, C. A. A., *Drug Discov. Today* **2003**, 8, 297-306.
c) Gallego, J., Varani, G., *Acc. Chem. Res.* **2001**, 34, 836-843.
d) Suchek, S. J., Wong, C. H., *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, 4, 678-686.
e) Chow, C. S., Bogdan, F. M., *Chem. Rev.* **1997**, 97, 1489-1513.
- [4] a) RNA, *Nature Insight* **2002**, 418, 6894.
b) RNA Special Issue, *ChemBioChem* **2003**, 10.
- [5] Cusack, S. , *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, 9, 66-73.
- [6] Batey, R. T., Rambo, R. P., Doudna, J. A., *Angew. Chem.* **1999**, 111, 2472-2491.
- [7] Draper, D. E., *J. Mol. Biol.* **1999**, 293, 255-270.
- [8] Drysdale, M. J., Lentzen, G., Matassova, N. , Murchie, A. I. H. , Aboul-Ela, F., Afshar, M., *Progress in medicinal chemistry* **2002**, 39, 74-117.
- [9] DeJong, E. S., Luy, B., Marino, J. P., *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2002**, 2, 289-302.
- [10] Froeyen, M., Herdewijn, P. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2002**, 2, 1123-1145.
- [11] Ye, X. S., Zhang, L.-H., *Current Medicinal Chemistry* **2002**, 9, 929-939.
- [12] Wilson, W. D. , Ke, L. *Current Medicinal Chemistry* **2000**, 7, 73-98.
- [13] Domingo, E., Ruiz-Jarabo, C. M., Sierra, S., Arias, A., Pariente, N., Baranowski, E., Escarmis, C., *Virus Res.* **2002**, 82, 39-44.
- [14] Karn J., *J. Mol. Biol.* **1999**, 293, 235-254.

- [15] Tan, Brodsky, A., Williamson, J. R., Frankel, A. D., *Seminars in Virology* **1997**, 8, 186-193.
- [16] Frankel, A. D., Young, J. A. T., *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, 67, 1-25.
- [17] Krebs, A., Ludwig, V., Boden, O., Goebel, M. W., *ChemBioChem* **2003**, 4, 972-978.
- [18] Tor, Y., *ChemBioChem* **2003**, 4, 998-1007.
- [19] Rijnbrand, R. C.A., Lemon, S. M., *Current topics in microbiol. Immunol.* **2000**, 242, 85-116.
- [20] Quelle: www.niaids.nih.gov, AIDS epidemic update, Dezember 2003.
- [21] Palella, F. J., Delaney, K. M., Moorman, A. C., Loveless, M. O., Fuhrer, J., Satten, G. A., Aschman, D. J., Holmberg, S. D., *The New England Journal of Medicine* **1998**, 338, 13, 853-860.
- [22] Karn J. , *J. Mol. Biol.* **1999**, 293, 235-254.
- [23] Wei, P., Garber, M.E., Fang, S.M., Fischer, W.H., Jones, K.A.(1998) *Cell* 92, 451–462.
- [24] Kaehlcke, K., Dorr, A., Hetzer-Egger, C., Kiermer, V., Henklein, P., Schnoelzer, M., Loret, E., Cole, P. A., Verdin, E., Ott, M., *Molecular Cell* **2003**, 167–176.
- [25] Zhou, C., Rana, T. M., *J. Mol. Biol.* **2002**, 320, 925–942.
- [26] Turner, B. G., Summers, M. F., *J. mol. Biol.* **1999**, 285, 1-32.
- [27] Paoletti, A. C., Shubsda, M. F., Hudson, B. S., Borer, P. N., *Biochemistry* **2002**, 41, 15423-15428.
- [28] Zeffman, A., Hassard, S., Varani, G., Lever, A., *J. mol. Biol.* **2000**, 297, 877-893.
- [29] Pustowka, A., Dietz, J, Ferner, J., Baumann, M., Landersz, M., Königs, Ch., Schwalbe, H., Dietrich, U., *ChemBioChem* **2003**, 4, 1093-1097.
- [30] Hoffmann, Kamps, et. al, *HIV Medicine* **2003**, Kapitel 2, 61-119.

- [31] Pani, A., Loi, A. G., Mura, M., Marceddu, T., La Colla, P., Marongiu, M. E., *Curr. Drug Targets: Infect. Disord.* **2002**, 2, 17-32.
- [32] Spearman, P., *Current HIV Research* **2003**, 1, 101-120.
- [33] Turpin, J. A., *Expert Rev. Anti-infect. Ther.* **2003**, 1, 97-128.
- [34] Esté A. J., *AIDS Rev.* **2001**, 3, 121-132.
- [35] Doranz, B. J., Grovit-Ferbas, K., Sharron, M. P., Mao, S.H., Goetz, M. B., Daar, E. S., Doms, R. W., O'Brien, W. A., *J. Exp. Med.*, **1997**, 186, 8, 1395-1400.
- [36] Daelemans, D., Schols, D., Witvrouw, M., Pannecouque, C., Hatse, S., Van Doren, S., Hamy, F., Klimkait, T., De Clercq, Vandamme, A.M., *Mol. Pharmacol.*, **2000**, 57, 116-124.
- [37] Williamson, J. R., *Nat. Struc. Biol.* **2000**, 7, 834-837.
- [38] Tan, R., Brodsky, A., Williamson, J. R., Frankel, A. D., *Seminars in Virology* **1997**, 8, 186-193.
- [39] Frankel, A. D., Young, J. A. T., *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, 67, 1-25.
- [40] Brodsky A. S., Williamson J. R., *J. mol. Biol.* **1997**, 267, 624-639.
- [41] Mei, H. Y., Galan, A. A., Halim, N. S., Mack, D. P., Moreland, D. W., Snaders, K. B., Truong, H. N., Czarnik, A. W., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, 5, 2755-2760.
- [42] Litovchick, A., Evdokimov, A. G., Lapidot, A., *Biochemistry* **2000**, 39, 2838-2852.
- [43] Litovchick, A., Evdokimov, A. G., Lapidot, A., *FEBS Lett.* **1999**, 445, 73-79.
- [44] Hermann, T. Westhof, E., *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 1250 -1261.
- [45] Puglisi, J. D., Tan, R., Calnan, B. J., Frankel, A. D., Williamson, J. R., *Science* **1992**, 257, 76-80.
- [46] Aboul-ela, F. Karn, J., Varani, G. *Nucleic Acids Res.* **1996**, 24, 3974–3981.
- [47] Nifosi, R., Reyes, M. C., Kollman, P. A., *Nucleic Acids Res.* **2000**, 28, 4944-4955.

- [48] Bailly, C., Colson, P., Houssier, C., Hamy, F., *Nucleic Acids Res.* **1996**, 24, 1460-1464.
- [49] Mei, H.Y., Mei, C., Heldsinger, A., Lemrow, S. M., Loo, J. A., Sannes-Lowery, K. A., Sharmeen, L., Czarnik, A. W., *Biochemistry* **1998**, 37, 14204-14212.
- [50] Hamy, F. Brondani, V., Flörsheimer, A., Stark, W., Blommers, M. J. J., Klimkait, T., *Biochemistry* **1998**, 37, 5086-5095.
- [51] a) Parolin, C., Gatto, B., Vecchio, C. D., Pecere, T., Tramontano, E., Cecchetti, V., Fravolini, A., Masiero, S., Palumbo, M., Palù, G., *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, 47, 3, 889-896.
- b) Richter, S., Parolin, C., Gatto, B., Del Vecchio, C., Brocca-Cofano, E., Fravolini, A., Palù, G., Palumbo, M., *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, 48, 5, 1895-1899.
- [52] Du, Z., Lind, K. E., James, T. L. *chemistry and biology* **2002**, 9, 707-712.
- Lind, K. E., Du, Z., Fujinaga, K., Peterlin, B. M., James, T. L., *Chem a. Biol.* **2002**, 9, 185-193.
- [53] Mayer, M., James, T., L., *J. Am. Chem. Soc.* , **2004**, 126, 4453-4460.
- [54] Davis, B., Afshar, M., Varani, G., Murchie, A. I. H., Karn, J., Lentzen, G., Drysdale, M., Bower, J., Potter, A. J., Starkey, I. D., Swarbrick, T., Aboul-ela, F., *J. mol. Biol.* **2004**, 336, 343-356.
- [55] Murchie, A. I. H., Davis, B., Isel, C., Afshar, M., Drysdale, M. J., Bower, J., Potter, A. J., Starkey, I. D., Swarbrick, T. M., Mirza, S., Prescott, C. D., Vaglio, P., Aboul-ela, F., Karn, J., *J. mol. Biol.* **2004**, 336, 625-638.
- [56] Hamy, F., Felder, E. R., Heizmann, G., Lazdins, J., Aboul-Ela, F., Varani, G., Karn, J., Klimkait, T., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997** ,94 ,3548 –3553.
- [57] Huq, I., Ping, Y., Tamilarasu, N., Rana, T.M., *Biochemistry* **1999**, 38, 5172 -5177;
- b) Garbesi, A., Hamy, F., Maffini, M., Albrecht, G., Klimkait, T., *Nucleic Acids Res.* **1998** ,26 ,2886-2890.
- [58] a) Wang, X., Huq, I., Rana, T.M., *J. Am. Chem. Soc.* **1997** ,119 ,6444 -6445;

- b) Tamilarasu, N., Huq, I., Rana, T.M., *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1597-1598;
- c) Tamilarasu, N., Huq, I., Rana, T.M., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 505-507.
- [59] Kesavan, V., Tamilarasu, N., Cao, H., Rana, T.M., *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 1171-1175.
- [60] Hwang, S., Tamilarasu, N., Ryan, K., Huq, I., Richter, S., Still, W. C., Rana, T. M., *Proc. Natl. Sci. USA* **1999**, *96*, 23, 12997-13002.
- [61] Tamilarasu, N., Huq, I., Rana, T.M., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 971-974.
- [62] Hwang, S., Tamilarasu, N., Kibler, K., Cao, H., Ali, A., Ping, Y., Jeang, K., Rana, T. M., *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278*, 40, 39092-39103.
- [63] Tauchi, T., Broxmeyer, H. E., *Int. J. Hematol.* **1995**, *61*, 105-112.
- [64] Kurzrock, R., Kantarjian, H. M., Druker, B. J., Talpaz, M., *Ann. Intern. Med.* **2003**, *138*, 819-830.
- [65] Kindler, T. Meyer, R. G., Fischer, T., *Expert Opin. Ther. Targets* **2002**, *6*, 1, 85-101.
- [66] Calabretta, B., Perrotti, D., *Blood* **2004**, *103*, 11, 4010-4022.
- [67] Deininger, M. W. N., Goldman, J. M., Melo, J. V., *Blood* **2000**, *96*, 10, 3343-3356.
- [68] Lydon, N. B., Druker, B. J., *Leukemia Research* **2004**, *28*, 29-38.
- [69] Tauchi, T., Ohyashiki, K., *Leukemia Research* **2004**, *28*, 39-45.
- [70] Lim, Y. M., Wong, S., Lau, G., Witte, O. N., Colicelli, J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 22, 12333-12338.
- [71] Meyer, E. A., Castellano, R. K., Diederich, F., *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 1244-1287.
- [72] Schöllkopf, U, *Pure Appl. Chem.* **1983**, *55*, 11, 1799-1806.
- [73] Evans, D. A., Britton, T. C., Ellman, J. A., Dorow, R. L., *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4011-4030.

- [74] Oppolzer, W., *Tetrahedron* **1987**, 43, 1969-2004.
- [75] Isaac, M., Slassi, A., Da Silver, K., Xin, T., *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 2957-2960.
- [76] O'Donnell, M. J., Bennett, W. D., Wu, S., *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111(6), 2353-2355.
- [77] Corey, E. J., Xu, F., Noe, M. C, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 12414-12415.
- [78] Maruoka, K., Ooi, T., *Chem. Rev.* **2003**, 103, 3013-3028; und darin zitierte Literatur.
- [79] O'Donnell, M. J., *Acc. Chem. Res.* **2004**, 37, 506-517; und darin zitierte Literatur.
- [80] Strecker, A., *Ann. Chem. Pharm.* **1850**, 75, 27.
- [81] Gröger, H., *Chem. Rev.*, 103, 2795-2827 und Referenzen darin; List, B., *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 5656-5657.
- [82] Krebs, A. Dissertation 2004, Universität Frankfurt,
- [83] Krebs, A., Ludwig, V., Pfizer, J., Dürner, G., Göbel, M. W., *Chem. Eur. J.*, **2004**, 10, 544-553.
- [84] Suhartono, M., Diplomarbeit **2004**, Universität Frankfurt.
- [85] Collier, P. N., Patel, I. Taylor, R. J. K., *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 7115-7119.
- [86] Collier, P. N., Patel, I. Taylor, R. J. K., *Tetrahedron* **2002**, 58, 6117-6125.
- [87] Collier, P. N., Patel, I., Raynham, T. M., Taylor, R. J. K., *Journal of Organic Chemistry* **2002**, 67, 1802-1815.
- [88] Myers, A. G., Schnider, P., Kwon, S., Kung, D. W., *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 3322-3327.
- [89] Chemler, S. R., Trauner, D., Danishefsky, S. J. *Angew. Chem.* **2001**, 113, 4676-4701.
- [90] Miyaura, N., Suzuki, A., *Chemical Review* **1995**, 95, 2457-2483.
- [91] Buchwald, S. L., *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 9722-9723.
- [92] Suzuki, A., *Journal of Organometallic Chemistry* **1999**, 576, 147-168.

- [93] Myers, A. G., Gleason J. L., Yang B. H., Chen H., *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, *116*, 9361-9362.
- [94] Myers A. G., Gleason J. L., Yoon T., *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8488-8489.
- [95] Myers A. G., Gleason J. L., Yoon T., Kung D. W., *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 656-673.
- [96] Pfizer, J. , *Diplomarbeit* **2001**, Frankfurt am Main.
- [97] Zhang, T. Y., Allen, M. J., *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 5813-5816.
- [98] a) Fernández, F., García-Mera, X., Molares, M., Rodriguez-Borges, J. E., *Synthesis* **2001**, *2*, 239-242;
b) Baston, E., Paluszczak, A., Hartmann, R. W., *Eur. J. Med. Chem.* **2000**, *35*, 931-940.
- [99] Rothenbücher, T., *Diplomarbeit* 2003, Universität Frankfurt.
- [100] Chan, W. C., White, P. D., *Fmoc solid phase peptid synthesis*, Oxford University press, **2000**.
- [101] Löffler, Petrides, *Biochemie & Pathobiochemie* **2003**, 7. Auflage, Springer Verlag Berlin-Heidelberg.
- [102] Matsumoto, C., Hamasaki, K., Mihara. H., Ueno, A., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 1857-1861.
- [103] Heinel, M., *Dissertation* **2004**, Frankfurt am Main.
- [104] Giel-Pietraszuk, M., Barciszewska, M. Z., Mucha, P., Rekowski, P., Kupryszewski, G., Barciszewski, J., *Acta Biochim. Pol.* **1997**, *44*, 3, 591-600.
- [105] Buskiewicz, I., Giel-Pietraszuk, M., Mucha, P., Rekowski, P., Kupryszewski, G., Barciszewska, M. Z., *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1998**, *63*, 842-850.
- [106] Fürtig, B., Richter, C., Wöhnert, J., Schwalbe, H., *ChemBioChem* **2003**, *4*, 936-962.
- [107] Brodsky, A. S., Williamson, J. R., *J. Mol. Biol.* **1997**, *267*, 624-639.

- [108] Geysen, H. M., Meloen, R. H., Barteling, S. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1984**, *81*, 3998-4002.
- [109] Scott, J. K., Smith, G. P., *Science*, **1990**, *249*, 4967, 386-390.
- [110] Devlin, J. J., Panganiban, L. C., Devlin, P. E., *Science*, **1990**, *249*, 4967, 404-406.
- [111] Cwirla, S. E., Peters, E. A., Barrett, R., W., Dower, W. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1990**, *87*, 6378-6382.
- [112] Fodor, S. P. A., Read, J. L., Pirrung, M. C., Stryer, L., Lu, A. T., Solas, *Science*, **1991**, *251*, 4995, 767-773.
- [113] Furka, A., Notarisierte Dokumentnummer 36237/1982, Dr. J. Bokai, State Notary Public, 15. Juni, 1982, Budapest.
- [114] Houghten, R. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 5131-5135.
- [115] Furka, A., Sebestyén, F., Asgedom, M., Dibó G., *Int. J., Peptide Protein Res.*, **1991**, *37*, 487-493.
- [116] Lam, S. K., Salmon, S. E., Hersh, E. M., Hruby, V. J., Kazmierski, W. M., Knapp, R. J., *Nature* **1991**, *354*, 82-84.
- [117] *Combinatorial Peptide and Nonpeptide Libraries*, Jung, G (Ed.), VCH-Verlagsgesellschaft mbH, **1996**, Kapitel: 6: Lam, K.S., Lebl, M., 173-195.
- [118] Brummel, C. L., Lee, I. N. W., Zhou, Y., Benkovic, S. J., Winograd, N., *Science*, **1994**, *263*, 399.
- [119] Kerr, J. M., Banville, S. C., Zuckermann, R. N., *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 2529-2531.
- [120] Brenner, S., Lerner, R. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1992**, *89*, 5381-5383.
- [121] Nicolauo, K. C., Xiao, X., Parandoosh, A., S., Nova, M., P., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1995**, *34*, 20, 2289-2291.
- [122] Ohlmeyer, M. H. J., Swanson, R. N., Dillard, L. W., Reader, J. C., Asouline, G., Kobayashi, R., Wigler, M., Still, W. C., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**, *90*, 10922-10926.

- [123] Nestler, H. P., Bartlett, P. A., Still, W. C. , *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 4723-4724.
- [124] Baldwin, J. J., Burbaum, J. J., Henderson, I., Ohlmeyer, M. H. J., *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5588-5589.
- [125] Merrifield, R., B., *J. Am. Chem. Soc.* , **1963**, *85*, 2149-2154.
- [126] Meldal, M., Svendsen, I., Breddam, K., Auzanneau, F., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1994**, *91*, 3314-3318.
- [127] Hwang, S., Tamilarasu, N., Ryan, K., Huq, I., Richter, A., Still, W. C., Rana, T. M. , *Proc. Natl. Aca. Sci. USA* **1999**, *96*, 12997-13002.
- [128] Krebs, A., Dissertation 2004, Frankfurt am Main.
- [129] Heinel, M. *Dissertation* **2004**, Frankfurt am Main.
- [130] Bäumlér, J. , Dissertation Frankfurt a. M. 2004.
- [131] Pustowka, A., Dietz, J., Ferner, J., Baumann, M., Landersz, M., Königs, C., Schwalbe, H., Dietrich, U., *ChemBioChem*, **2003**, *4*, 1093-1097.
- [132] Myers, A. G., Schnider, P., Kwon, S., Kung, D. W., *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 3322.
- [133] Krebs, A., Ludwig, V., Pfizer, J., Dürner, G., Göbel, M. W., *Chem. Eur. J.*, **2004**, *10*, 544-553.

16.2 Abkürzungsverzeichnis

AIDS	Acquired immune deficiency syndrome
9-BBN	9-Borabicyclo[3.3.1]nonan
Boc <i>tert</i>	Butoxycarbonyl
Cbz	Carbonyloxybenzyl
CML	Chronisch myeloische Leukämie
DBAD	Di- <i>tert</i> -butylazodicarboxylat
de	Diastereomerenüberschuss
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DMAP	N,N-Dimethylaminopyridin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dppf	Bis(diphenylphosphanyl)ferrocen
ee	Enantiomerenüberschuss
equiv.	Äquivalente
ESI-MS	Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie
EtOAc	Ethylacetat, Essigsäureethylester
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FRET	Fluoreszenz-Resonanz Energie Transfer
FT-IR	Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie
gp	Glycoprotein
HAART	High active antiretrovirale therapy
Hex	Hexan

HIV	Human Immunodeficiency Virus
HOBt	Hydroxybenzotriazol
IC ₅₀	half inhibition concentration
IN	Integrase
IR	Infrarot
IRES	internal ribosomal entry side
LDA	Lithiumdiisopropylamid
LiHMDS	Lithiumhexamethyldisilazid
LTR	long terminal repeats
Mtr	4-Methoxy-2,3,6-trimethylbenzolsulfonyl
NMR	Nuklearmagnetische Resonanz
PBS	PBS Primer binding site
PR	Protease
PTC	Phasentransferkatalysator
RFU	Relative Fluorescence Units
RNA	Ribonukleinsäure
RRE	Rev responsive element
RT	Reverse Transkriptase, Raumtemperatur
Smp	Schmelzpunkt
TAR	<i>Trans</i> -Activation Responsive
TBS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Trimethylsilyl
Triton - X	Alkylphenylpolyethylenglycol
UV	Ultraviolett

16.3 Lebenslauf

Zur Person: Verena Ludwig
geboren am 22.05.1974 in Bückeburg
ledig

Schulische und berufliche Ausbildung:

1980 - 1986	Grundschule / Orientierungsstufe Bückeburg
1986 - 1990	Herderschule Bückeburg (Realschule)
1990 - 1993	Neues Gymnasium Stadthagen (Allgemeine Hochschulreife)
1993 - 1995	Ausbildung zur chemisch-technischen Assistentin, Berufsbildende Schulen 22 der Landeshauptstadt Hannover
10/1995	Aufnahme des Chemiestudiums an der Universität Hannover
10/1997	Diplomchemiker-Vorprüfung
04/2000	Diplomchemiker-Hauptprüfung
05/2000 -12/2000	Diplomarbeit im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. E. Winterfeldt am Institut für Organische Chemie der Universität Hannover mit dem Thema: „Cyclische Additionen mit steroidal-Dienen“
04/2001 – 01/2005	Promotion bei Herrn Prof. Dr. M. W. Göbel am Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie der Universität Frankfurt.

16.4 Publikationsverzeichnis

Classification and prediction of ligands inhibiting HIV-1 Tat/TAR RNA interaction using a self-organizing map (SOM), A. Givehchi, V. Ludwig, O. Boden, A. Krebs, U. Scheffer, M. Göbel, G. Schneider, in Vorbereitung zur Veröffentlichung bei: J. Mol. Recog.

Metall-free catalysts for the hydrolysis of RNA derived from Guanidines, 2-Aminopyridines, and 2-Aminobenzimidazoles; U. Scheffer, A. Strick, V. Ludwig, S. Peter, E. Kalden, M. W. Göbel, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127 (7), 2211-2217.

New inhibitors of the Tat-TAR RNA interaction found with a fuzzy pharmacophore model; S. Renner, V. Ludwig, O. Boden, U. Scheffer, M. W. Göbel, G. Schneider, *ChemBioChem*, **2005**, 6, 1119-1125.

Synthetic α -Amino Acids as Building Blocks for Novel RNA Ligands; A. Krebs, O. Boden, V. Ludwig, M. W. Göbel, *Peptide Revolution: Genomics, Proteomics & Therapeutics*, (Hrsg.: M. Chorev & T. K. Sawyer), Proceedings of the Eighteenth American Peptide Symposium, American Peptide Society, Boston, **2004**, 229-230.

Enantioselective Synthesis of Non-Natural Aromatic α -Amino Acids; A. Krebs, V. Ludwig, J. Pfizer, G. Dürner, M. W. Göbel, *Chem. Eur. J.*, **2004**, 10, 544-553.

Targeting the HIV Trans-Activation Responsive Region - Approaches Towards RNA-Binding Drugs; A. Krebs, V. Ludwig, O. Boden, M. W. Göbel, *ChemBioChem*, **2003**, 4, 972-978.

A practical route to a complex bis-steroidal diene intermediate using a microwave assisted Heck reaction; T. Flessner, V. Ludwig, H. Siebeneicher, E. Winterfeldt, *Synthesis*, **2002**, 10, 1373.

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, daß ich die vorgelegte Dissertation über „Auxiliarvermittelte Synthese von nicht-natürlichen Aminosäuren als Bausteine für RNA-Liganden“ selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, daß aus Schriften Entlehnungen, soweit sie in der Dissertation nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Schrift bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben.